

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Erprobung eines neuen degradierbaren,
metallischen Knochenersatzwerkstoffes**

von Hanns Manuel Zeus
aus München

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Angefertigt am: Klinikum der Universität München, Campus Großhadern,
Orthopädische Klinik und Poliklinik

Mentor: Priv.-Doz. Dr. Bernd Wegener

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Referent: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 29.07.2017

Meiner Familie

„... mühsam nährt sich das Eichhörnchen ...“

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 EIGENSCHAFTEN RESORBIERBARER KNOCHENERSATZWERKSTOFFE.....	1
1.2 ÜBERSICHT RESORBIERBARER KNOCHENERSATZWERKSTOFFE.....	2
1.3 GESAMTPROJEKTBE SCHREIBUNG.....	7
1.4 FRAGESTELLUNG DER DISSERTATION.....	8
2 MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1 IMPLANTATIONSMATERIAL.....	9
2.2 BEFÜLLUNG UND BEARBEITUNG DER METALLSCHÄUME	11
2.3 VERSUCHSAUFBAU.....	13
2.3.1 Versuchstiere.....	13
2.3.2 Tierhaltung.....	13
2.3.3 Tierversuchsantrag und statistische Beurteilung.....	14
2.3.4 Gruppeneinteilung der Tiere.....	14
2.4 OPERATIONSMETHODE.....	16
2.4.1 Narkose und OP-Vorbereitung.....	16
2.4.2 Operativer Eingriff.....	16
2.5 EUTHANASIE.....	19
2.6 BILDGEBENDE VERFAHREN.....	20
2.6.1 Röntgenologische Untersuchung.....	20
2.6.2 Computertomographie.....	22
2.6.3 Kontaktradiographie.....	23
2.7 HISTOPATHOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER ENTNOMMENEN PROBEN.....	23
2.7.1 Organentnahme und Sektion der Versuchstiere.....	23
2.7.2 Histopathologische Aufarbeitung und Beurteilung der Organproben.....	24
2.7.3 Histopathologische Aufarbeitung und Beurteilung der Tibiakopfpräparate.....	26
2.7.4 Statistische Methodik für die histopathologischen Befunde.....	28
2.8 LABORWERTERHEBUNG UND AUSWERTUNG.....	29
2.8.1 Blutprobenentnahme.....	29
2.8.2 Aufarbeitung der Blutproben.....	30
2.8.3 Statistische Methodik für die Laborbefunde.....	30

3 ERGEBNISSE.....	31
3.1 VERLAUF DES TIERVERSUCHS.....	31
3.1.1 Mortalität, Erkrankungen und Gruppenwechsel der Versuchstiere.....	31
3.1.2 Endgültige Gruppeneinteilung.....	31
3.2 MAKROSKOPISCHE BEURTEILUNG.....	32
3.3 HISTOPATHOLOGISCHE ERGEBNISSE.....	33
3.3.1 Mikroskopische Auswertungen der Tibiakopfpräparate.....	33
3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG ENTNOMMENER ORGANPROBEN.....	44
3.4.1 Eisenablagerungen in den Organen.....	44
3.4.2 Entzündliche Veränderungen in den Organen.....	46
3.5 BEURTEILUNG DER KONTAKTRADIOGRAPHIE.....	51
3.6 BLUTBILD UND DIFFERENZIALBLUTBILD.....	54
3.7 SERUMWERTE.....	54
3.7.1 Alkalische Phosphatase.....	54
3.7.2 Eisen, Phosphor, Ferritin.....	59
4 DISKUSSION.....	63
4.1 TIERVERSUCH.....	63
4.2 HISTOPATHOLOGIE.....	64
4.2.1 Organproben.....	64
4.2.2 Tibiakopfpräparate.....	66
4.3 KONTAKTRADIOGRAPHIE.....	69
4.4 LABORPARAMETER.....	70
4.4.1 Referenzwerte.....	70
4.4.2 Alkalische Phosphatase.....	70
4.4.3 Serumeisen und Ferritin.....	73
4.4.4 Phosphor.....	74
4.4.5 Blutbild und Differenzialblutbild.....	76
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	81
6 SUMMARY.....	83
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	85
8 ANHANG.....	97
9 DANKSAGUNG.....	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALPL	alkaline phosphatase, liver/kidney/bone
Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CPC	Kalziumphosphatzement
CT	Computertomographie
df	degree of freedom
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-Modul	Elastizitätsmodul
EKG	Elektrokardiogramm
Fa.	Firma
FeP	Eisen-Phosphor
FePSi	Eisen-Phosphor-Silizium
GPa	Gigapascal
i.v.	intravenös
ln.	lymphonodus
lnn.	lymphonodi
Mg-CPC	Magnesium modifizierter Kalziumphosphatzement
MMA	Methylmethacrylat
MPC	Magnesiumphosphatzement
p.op	post operationem
ppi	pores per inch
ROI	region of interest
s.c.	sub cutan
SBF	simulated body fluid
TPLO	tibial plateau leveling osteotomy
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Knochenersatzstoffe kommen in der heutigen Medizin, insbesondere in der Orthopädie und Unfallchirurgie vielseitig zum Einsatz. Bereits in den 70er Jahren kamen resorbierbare Implantate auf, die, wie sich selbst auflösendes Nahtmaterial, aus Polylactiden und Polyglycoliden hergestellt wurden. Trotz einiger Fehlversuche gelang es in den 90er Jahren resorbierbare Implantate zu entwickeln, die erfolgreich klinisch eingesetzt werden konnten (WINTERMANTEL & HA, 2008). Bei der Versorgung von Frakturen, zur Auffüllung von Defekten z.B. nach der Entfernung eines Knochentumors, in der Wirbelsäulenchirurgie oder bei angeborenen Erkrankungen wird Knochenersatzmaterial häufig verwendet (GIANNOUDIS et al., 2005). Dabei kommen sehr unterschiedliche Werkstoffe zum Einsatz.

1.1 Eigenschaften resorbierbarer Knochenersatzwerkstoffe

Alle Knochenersatzwerkstoffe müssen bestimmte Anforderungen erfüllen, um einen erfolgreichen Einsatz zu gewährleisten. Die Implantate sollen in der Lage sein, die Knochenneubildung anzuregen (Osteoinduktivität). Zudem ist es wichtig, dass das implantierte Material als Leitgerüst das natürliche Knochenwachstum erleichtert (Osteokonduktivität) und eine mechanisch kompetente Verbindung zwischen Knochen und Werkstoff ermöglicht. Die eingesetzten Materialien dürfen dabei keine Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe auslösen (Biokompatibilität) und sollen darüber hinaus im Idealfall resorbierbar sein (GIANNOUDIS et al., 2005).

Insbesondere die Forderung nach mechanischer Belastbarkeit stellt die Materialforschung immer wieder vor neue Herausforderungen. Die auftretende Belastung sollte nach erfolgter Implantation sofort in vollem Umfang aufgenommen werden können. Im besten Fall wird im Verlauf der Degradation bzw. Resorption diese Aufgabe dann von neugebildetem Knochen übernommen (CLAES, 1992; HOFMANN & CLAES, 1992). Faktoren wie

Anwenderfreundlichkeit und Wirtschaftlichkeit dürfen bei der Auswahl eines geeigneten Implantates nicht außer Acht gelassen werden. So ist bei der Verwendung resorbierbarer Implantate in der Regel keine zweite Operation zur Entfernung des eingebrachten Materials notwendig, was nicht nur wirtschaftliche Vorteile, sondern auch Entlastung für den Patienten mit sich bringt (RÄIHÄ, 1992). Eine weitere wichtige Eigenschaft von degradierbaren Knochenersatzwerkstoffen ist die Sterilisierbarkeit bzw. die Möglichkeit, die Implantate unter sterilen Bedingungen produzieren zu können.

1.2 Übersicht resorbierbarer Knochenersatzwerkstoffe

Resorbierbare Knochenersatzwerkstoffe sind definitionsgemäß Stoffe, die entweder eigenständig oder in Verbindung mit anderen Materialien den Knochenheilungsprozess fördern und durch körpereigene Stoffwechselvorgänge abgebaut werden können (SCHNÜRER et al., 2003). Da sich die verwendeten Materialien zum Teil erheblich in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften unterscheiden, sollen im Folgenden die wichtigsten resorbierbaren Implantatmaterialien aufgeführt und erläutert werden.

Autologer Knochen:

Autologer Knochen stellt den wichtigsten Vertreter der Knochenersatzstoffe dar, ist aber nur begrenzt verfügbar. Er wird in den meisten Fällen aus dem Kamm der Beckenschaufel, dem Tibiakopf oder der Fibula entnommen. Eine Entnahme von sowohl spongiösem als auch kortikalem Knochen ist an allen genannten Lokalisationen möglich (HEINEMANN et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit zur Entnahme bietet die Reamer-irrigator-aspiration-Technik (RIA-Technik). Hierbei werden feine Knochenfragmente im Rahmen einer Markraumerweiterung aus dem Femur entnommen, was ein weitaus geringeres Komplikationsrisiko birgt als die Entnahme aus der Beckenschaufel (KOBBE et al., 2008).

Die Verwendung von autologem Knochen erscheint in Hinblick auf Biokompatibilität, Osteokonduktivität und Osteoinduktivität nahezu optimal

(GIANNOUDIS et al., 2005). Es ist jedoch zu bedenken, dass die Möglichkeit zur Entnahme von autologem Knochen stark eingeschränkt ist (GIANNOUDIS et al., 2005). Ebenso gilt es, das durch die zusätzliche Operation zur Gewinnung des autologen Knochens entstehende Risiko sowie die hinzukommende Belastung durch einen verlängerten Klinikaufenthalt, abzuwägen (GIANNOUDIS et al., 2005). Außerdem besteht eine nicht zu vernachlässigende „Donor-site-morbidity“, also Beschwerden, welche durch die Entnahme des autologen Knochens verursacht werden (CALORI et al., 2014).

Xenogener Knochenersatz:

Bei der Verwendung von xenogenem bzw. allogenen Knochen werden sowohl kortikaler als auch spongioser Knochen eingesetzt. In den meisten Fällen wird das Material von Rindern gewonnen und in weiteren Verfahren wie Entmineralisierung, Sterilisation und Entproteinierung entsprechend aufbereitet. Der so bearbeitete Knochenersatzstoff gilt als osteokonduktiv und hinreichend gut verträglich. Die Gefahr einer Übertragung von Infektionen kann durch die Aufbereitung weitestgehend ausgeschlossen werden (VALENTINI & ABENSUR, 1997; GUARNIERI et al., 2016). Ein klarer Vorteil von xenogenem Knochen ist die hohe Verfügbarkeit und die Entlastung des Patienten, da diesem ein weiterer Eingriff zur Gewinnung von autologem Knochen erspart bleibt (BLOCK & POSER, 1995). Nachteile des xenogenen Knochenersatzes werden in erster Linie durch die Aufbereitung bedingt. So reduzieren sich beispielsweise die Osteoinduktivität und die mechanische Belastbarkeit zum Teil erheblich (GIANNOUDIS et al., 2005; HEINEMANN et al., 2011). Heutzutage wird xenogener Knochenersatz unter anderem in der Dentalimplantologie und der orthopädischen Chirurgie eingesetzt (SHARIF et al., 2016).

Synthetische Polymere und Composite:

Synthetische Polymere bestehen aus Polyester wie z.B. Poly-L-Lactid, Poly-D-L-Lactid und Polyglycolid sowie deren Polymeren und können in den verschiedensten Formen und Größen hergestellt werden. Als Pins, Schrauben,

Anker und Nahtmaterial werden sie sowohl klinisch als auch experimentell eingesetzt und werden dort z.B. zur Therapie chondraler sowie osteochondraler Defekte verwendet. Die Degradation von Polymeren erfolgt durch hydrolytische Spaltung und variiert sehr stark in ihrer Geschwindigkeit, je nach Zusammensetzung und Strukturmerkmalen wie Porosität oder Oberflächenbeschaffenheit (HOLLINGER & BATTISTONE, 1986; JANSSON et al., 2000; WEGENER et al., 2009; WEGENER et al., 2010).

Keramische Werkstoffe und Biogläser:

Keramiken gehören zu den anorganischen Stoffen, die entweder synthetisch hergestellt oder biologisch aus boviner Spongiosa oder dem Exoskelett von Korallen gewonnen werden können (SCHNÜRER et al., 2003). Die am häufigsten verwendeten keramischen Materialien stellen Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ und Tricalciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dar. Da diese Verbindungen selbst im Knochen vorkommen, liegt ihre Verwendung als Ersatzstoffe nahe. Aufgrund der eingeschränkten mechanischen Belastbarkeit werden diese hauptsächlich als Füllstoffe bei Knochentransplantationen oder als Beschichtung in der Prothetik verwendet (WITTE et al., 2008).

Kommt es zum Einsatz von Knochenzementen, spielen Calciumphosphat und Calciumsulfat in diversen Zusammensetzungen eine wichtige Rolle. Aus ihnen können Pasten hergestellt werden, die direkt in situ angewendet werden können. Eine hohe Porosität der ausgehärteten Masse wirkt sich zwar positiv auf die Resorptionsgeschwindigkeit aus, verhält sich aber indirekt proportional zur Stabilität (TAKAGI & CHOW, 2001).

Biogläser bestehen häufig aus Siliziumdioxid SiO_2 , Calciumoxid CaO oder Phosphorpentoxid P_2O_5 und durchlaufen einen langwierigen Herstellungsprozess mit Schmelztemperaturen von ca. 1500°C (SCHNÜRER et al., 2003). Als Gewebestücke, Granulat oder injizierbare Pasten werden Keramiken und Biogläser zur Therapie von Knochendefekten eingesetzt und tragen unter anderem zur Brückenbildung zwischen Knochenfragmenten bei (WITTE et al., 2008).

Degradierbare Metalle:

Sämtliche oben genannte Knochenersatzwerkstoffe eignen sich derzeit mangels ausreichender mechanischer Belastbarkeit nur zur Überbrückung von Defekten, die zusätzlich mechanisch stabilisiert werden. Die Verwendung metallischer Legierungen scheint in Bezug auf deren Materialeigenschaften wie Festigkeit und Härte nahezu optimal (WITTE et al., 2005). Im Gegensatz zu früheren Metalllegierungen, die so beständig wie möglich sein sollten, ist es dabei wichtig, dass die korrosiven Eigenschaften der degradierbaren Metalle erhalten bleiben und dadurch der Abbauprozess von Implantaten bis zu einem gewissen Maß vorhersehbar bzw. steuerbar wird. Wie eingangs erwähnt, soll die auftretende Belastung nach erfolgter Implantation sofort in vollem Umfang durch das Implantat aufgenommen werden können. Schrittweise soll im Verlauf der Degradation bzw. Resorption diese Aufgabe dann von neugebildetem Knochen übernommen werden (CLAES, 1992; WITTE, 2010). Dies setzt aber einen zeitlich angepassten Degradationsprozess voraus.

Um ein Einwachsen von Gefäßen und ersten Knochenschichten in das Implantat zu ermöglichen, ist die Verwendung eines offenporigen Materials notwendig (KLAWITTER & HULBERT, 1971; FLATLEY et al., 1983). In Studien hat sich eine Porengröße von 50–400 µm als geeignet erwiesen (PILLIAR, 1983).

Magnesiumbasierte offenporige Legierungen:

Magnesiumlegierungen werden heute vor allem in der Kardiologie, der Kardiochirurgie sowie der Orthopädie experimentell erprobt und auch bereits klinisch eingesetzt (HEUBLEIN et al., 2003; ZARTNER et al., 2005; WITTE et al., 2007). Die rasche Korrosion von Magnesium und seinen Legierungen unter physiologischen Bedingungen führte zunächst dazu, dass es klinisch in der Orthopädie nicht angewendet wurde. Limitierend für den intraossären Einsatz war zudem die durch die schnelle Korrosion bedingte Bildung von wasserstoffhaltigen Gasblasen (WITTE et al., 2005). Da für Wasserstoff kein physiologischer Transportmechanismus existiert, ist die Eliminierung nur über Lösung, Diffusion

und Abtransport in extrazellulärer Flüssigkeit möglich und geschieht entsprechend langsam (OHTA, 2014). Erst durch die Zugabe von seltenen Erden, Aluminium, Kalzium und Zink ließen sich die Korrosionseigenschaften von Magnesiumlegierungen deutlich verbessern (AGARWAL et al., 2016). Auch verhindert eine Mikrolegierung mit Germanium wirkungsvoll eine vorzeitige Korrosion von Magnesium (LIU et al., 2016).

Magnesiumlegierungen weisen in etwa einen Elastizitätsmodul von $E=44$ GPa auf und sind daher für die Überbrückung von Knochendefekten in Bereichen mit hoher mechanischer Beanspruchung weniger geeignet (SONG, 2007; YUSOP et al., 2012). Zudem kann bei der Verwendung von Magnesiumlegierungen die mechanische Belastbarkeit lediglich bis zu zwölf Wochen sichergestellt werden, was die Verwendung als lasttragendes Element weiter einschränkt (LIU et al., 2014).

Eisenbasierte offenporige Legierungen:

Im Gegensatz zu Magnesium weisen die meisten Eisenlegierungen einen Elastizitätsmodul von bis zu $E=211$ GPa auf, was diese für den Einsatz in mechanisch beanspruchten Knochendefekten als geeigneter erscheinen lässt (YUSOP et al., 2012).

Eisen stellt für den Organismus von Menschen und Tieren ein wichtiges Element dar. Als Zentralatom von Hämoglobin ist es am Transport, der Aktivierung und der Lagerung von molekularem Sauerstoff beteiligt und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Protein-, Lipid- und DNA-Schäden (FONTECAVE & PIERRE, 1993; MUELLER et al., 2006).

In der Natur kommt Eisen nur selten in Reinform vor. Es findet sich hauptsächlich als Eisenoxid, welches in Form von Hydroxid auftritt. Nach Kieselsäure und Tonerde kommen Eisenoxide am dritthäufigsten in der Erdkruste vor. Erst ab einem Eisengehalt von ca. 25% kann Eisenerz technisch verwertet werden (WINNACKER & KÜCHLER, 1961).

Eisenbasierte degradierbare Implantate wurden zunächst in der Form von Stents

an Mäusen, Kaninchen und Schweinen experimentell erprobt. Die Implantate erwiesen sich als biokompatibel. Toxische Degradationsprodukte konnten nicht nachgewiesen werden. Es fanden sich Eisenablagerungen in direkter Umgebung des Implantates sowie in entfernten Zellen. Jedoch verläuft der Abbau eisenbasierter Legierungen *in vivo* deutlich langsamer als aufgrund von *in vitro*-Versuchen zu vermuten gewesen wäre (PEUSTER et al., 2001; PEUSTER et al., 2006; MUELLER et al., 2012). Eine Studie aus 2009 gibt für reines Eisen eine Degradationsrate von 20,4 µg/h an (ZHU et al., 2009). Hier gilt es durch Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit und Hinzufügen von Legierungselementen die Degradationseigenschaften eisenbasierter Verbindungen zu optimieren.

1.3 Gesamtprojektbeschreibung

Das Kooperationsprojekt „DegraFer“ (Projektleitung: PD Dr Bernd Wegener, Klinikum der Universität München, Orthopädische Klinik und Poliklinik) beschäftigt sich mit der Entwicklung von belastbaren und resorbierbaren Implantaten auf der Basis von zellulären Metallschäumen. In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und angewandte Materialforschung, Institutsteil Dresden (IFAM) und dem Fraunhofer Institut für Keramische Technologien und Systeme, Dresden (IKTS) wurden Implantate unterschiedlicher eisenbasierter Legierungen hergestellt und charakterisiert. Im Tierversuch kamen eine FeP- und eine FePSi-Legierung zum Einsatz. Eine Mg-CPC-Paste, mit der die Implantate befüllt wurden, wurde vom Projektpartner InnoTERE GmbH, Radebeul entwickelt. Die Anfertigung und Auswertung der Hartschnittpräparate erfolgte an der Anatomischen Anstalt Lehrstuhl II – Neuroanatomie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Paraffinschnitte, Röntgen- und CT-Aufnahmen wurden an verschiedenen Instituten und Kliniken der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt und ausgewertet. Gleiches gilt für die untersuchten Blutparameter. Als Hauptzielgrößen gilt es, die Knochenregeneration und die Resorption des

Implantates zu untersuchen. Zudem werden sämtliche Ablagerungen des abgebauten Eisens in Organen wie Milz, Leber, Niere und Lymphknoten erfaßt. Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung als Preisträger im Innovationswettbewerb zur Förderung der Medizintechnik 2010 prämiert.

Die Dissertationsleistung dieser Arbeit besteht in der Planung und Durchführung der Tierversuche, der statistischen Aufarbeitung und Analyse der Labordaten und pathohistologischen Befunde sowie deren wissenschaftlicher Diskussion.

1.4 Fragestellung der Dissertation

Die Implantate werden im Tierversuch in Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht:

1. Kommt es nach der Implantation von metallischen, degradierbaren Knochenersatzstoffen zu entzündlichen Reaktionen im umliegenden Gewebe, tributären Lymphknoten und den untersuchten Organen?
2. Welche Degradationseigenschaften weisen die jeweiligen Implantate auf?
3. Kommt es zu Eisenmehrablagerungen in den untersuchten Organen der Tiere?

2 Material und Methoden

2.1 Implantationsmaterial

Als Implantate werden zelluläre, degradierbare Metallschäume verwendet, welche vom Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (IFAM, Dresden) sowie dem Fraunhofer Institut für keramische Technologien und Systeme (IKTS, Dresden) entwickelt, gefertigt und charakterisiert wurden.

Zunächst wurden durch den Kooperationspartner mittels eines pulvermetallurgischen Verfahrens Metallfolien gegossen, und diese auf ihre Mikroporosität sowie Degradationseigenschaften hin untersucht. Zum Einsatz kamen Eisenlegierungen mit Phosphor, Silizium, Wolfram und Bor. In der Mikrostrukturanalyse zeigte eine Zugabe von Phosphor die günstigsten Eigenschaften. Hierfür wurden metallographische Schliffe angefertigt, welche lichtmikroskopisch beurteilt und im Anschluss digital erfasst wurden. Die Untersuchung der Mikroporosität erfolgte computergestützt. Ohne Phosphor wiesen die Proben eine hohe Mikroporosität auf, was sich negativ auf die Festigkeit des späteren Implantates auswirkt (Abb. 1). Die in Abb. 1 sichtbaren großen Poren sind durch das Gießverfahren entstanden und haben keine Bedeutung für das spätere Implantat (WEGENER, 2012).

Die Korrosionseigenschaften wurden mithilfe des Polarisationswiderstandes untersucht. Hierbei sprechen niedrige Werte für ein korrosionsfreudiges Material. Die entsprechenden Legierungen sollten dann in der eigenen Studie zum Einsatz kommen. Die Messungen erfolgten bei 37°C in einer SBF-Lösung (simulierte Körperflüssigkeit). Bei der Untersuchung verschiedener Legierungen zeigte sich, dass die als korrosionsfreudig geltenden Mn-Legierungen weitaus weniger unterschiedliche Polarisationswiderstände besitzen als Si-Legierungen. Bei der rasterelektronenmikroskopischen Analyse zeigte sich vor allem bei Silizium-Legierungen eine starke Flächenkorrosion, welche im Gegensatz zur

Lochfraßkorrosion den gleichmäßigen Abtrag eines Implantates begünstigt (WEGENER, 2012).

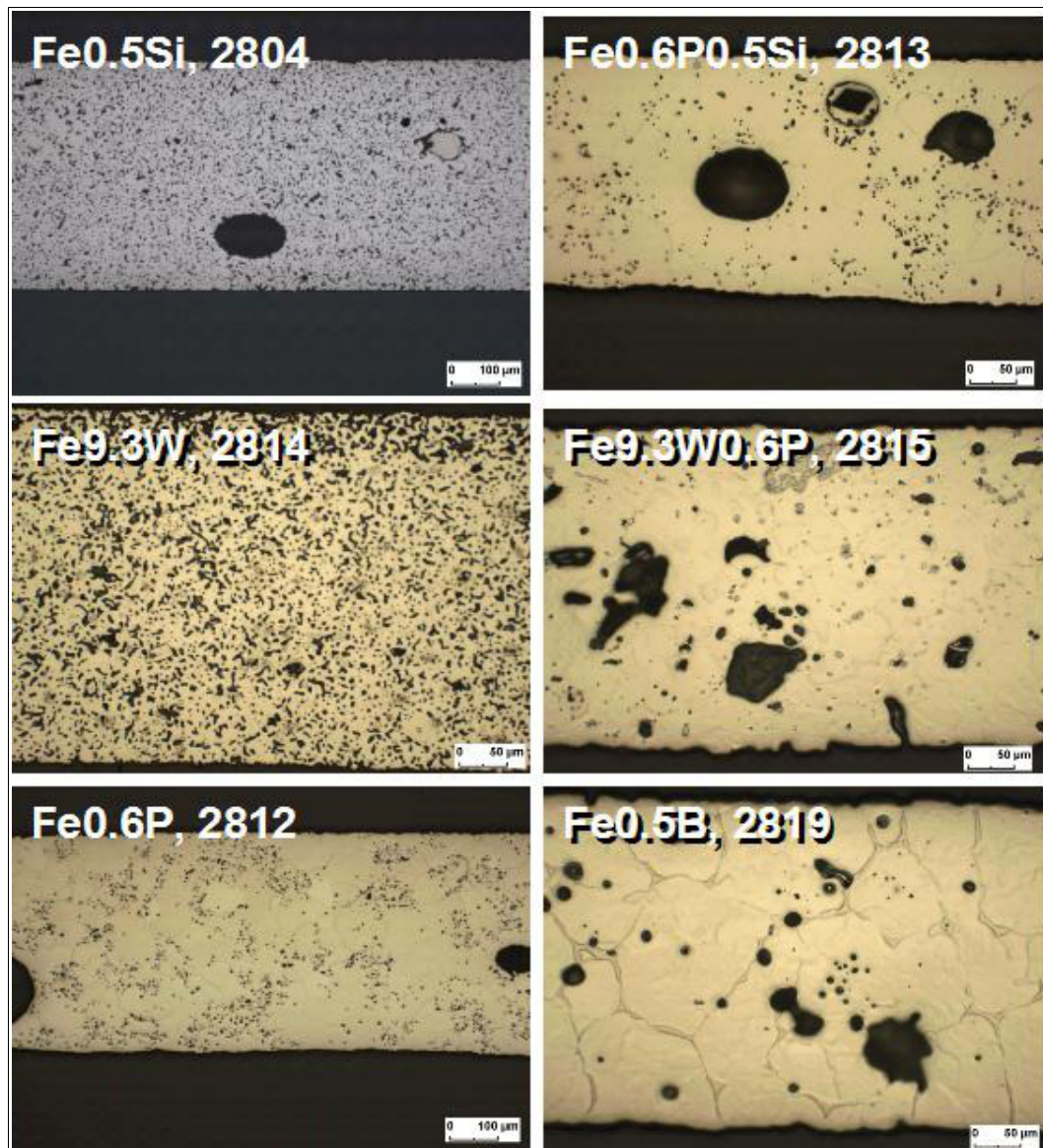


Abbildung 1: Metallographische Schlitte, Mikrostruktur einiger mittels Folien gießen hergestellter Proben mit den Legierungselementen Eisen, Silizium, Phosphor, Wolfram und Bor (Quelle: IFAM, Dr. Quadbeck)

Im Anschluss daran wurde eine Rezeptur zur Beschichtung der Schaumbauteile, welche das Grundgerüst für die späteren Implantate darstellen, entwickelt. Ziel war es, eine hohe Offenzelligkeit und eine geringe Anzahl von Benetzungsfehlern

zu erreichen. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Fe46 (BASF®) sowie einer Fe55 (BASF®) Rezeptur erzielt. Wegen des höheren Kohlenstoffgehaltes und der damit zu erwartenden besseren Festigkeit wurde für die Eisen-eisenphosphid Suspension die Fe55 Rezeptur verwendet. Als rheologisches Additiv diente Mineralöl. Um das Korrosionsverhalten der Metallschäume zu begünstigen, wurden den Suspensionen weitere Legierungselemente auf Basis von Wolfram und Silizium hinzugefügt.

Die anschließende Entbinderung erfolgte in drei Stufen und wurde unter einer Argon-Wasserstoff-Atmosphäre durchgeführt. Sie dient der Entfernung organischen Materials. Im Folgenden fand die Sinterung unter reiner Wasserstoff-Atmosphäre statt. Je nach Legierung lag die Sintertemperatur zwischen 1080°C und 1180°C. Auf diese Weise konnten Metallschäume mit einer Porosität von 92-95% sowie einer Dichte von 0,4 bis 0,6g/cm³ hergestellt werden. Im weiteren Verlauf wurden die Porenweite sowie das Gefüge der Schaumbauteile charakterisiert. Es ergab sich eine maximale Abweichung zwischen den Messwerten vor und nach der Sinterung von 20%, was eine gute Zellhomogenität bedeutet. Die endgültige Porosität betrug 70ppi. Die lichtmikroskopische Untersuchung der metallographischen Schliffe zeigte eine geringere Restporosität der Fe_{0,6}P- und Fe_{0,5}Si-Legierungen im Gegensatz zu den wolframhaltigen Proben. Aus dem axialen Drucktest nach DIN 50134 ergaben sich für phosphorhaltige Schäume besonders hohe Werte für die obere Quetschgrenze sowie für die Spannung bei Verformung um 1%. Die Elastizität der Bauteile lag deutlich unter den Werten von Knochen. Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse wurden für den Tierversuch Fe_{0,6}P- und Fe_{0,5}Si_{0,6}P-Legierungen verwendet.

2.2 Befüllung und Bearbeitung der Metallschäume

Vom Projektpartner InnoTERE GmbH, Radebeul wurde eine mit Magnesium modifizierte Kalziumphosphatzementpaste (Mg-CPC) entwickelt, um die Schaumstruktur der Implantate damit auszufüllen. Mg-CPC zeichnen sich im

Vergleich zu reinem Kalziumphosphatzement (CPC) durch eine kürzere Degradationszeit und eine höhere Festigkeit von mindestens 60 MPa aus. Dies ermöglicht eine Reduktion der Metallmenge bei gleicher Festigkeit des Implantates sowie ein schnelleres Einwachsen des Knochens. Calciumphosphatzemente werden von Osteoklasten abgebaut und durch neugebildeten Knochen ersetzt (XU et al., 2009), während das Metallschaumimplantat durch die zu erwartende längere Degradationszeit als Stütze und Leitgerüst dient. Vergleichbare Zementpasten kamen bereits in Vorversuchen der InnoTERE GmbH zum Einsatz und wurden als gut verträglich und osteoinduktiv getestet (mündliche Mitteilung Fa. InnoTERE GmbH).

Nachdem die Viskosität der Zementpaste der Porengröße angepasst war, wurden die Metallschaumbauteile mithilfe einer Kolbenspritze befüllt. Nach Aushärten der befüllten Implantate erfolgte die weitere Bearbeitung wieder im Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und angewandte Materialforschung, Institutsteil Dresden (IFAM). Durch Zuschneiden und anschließendes Schleifen erhielten die Implantate ihre keilförmige Geometrie (Abb. 2). Die Maße der Implantate betrug 20mm x 10mm x 5mm bzw. 3,5mm Um eine gute Verankerung im Knochen zu gewährleisten, sollte der Metallschaum den Zement überragen. Daher wurden alle Implantate in einer kommerziellen Sandstrahlanlage mit autoklaviertem Aluminiumoxid mit einer mittleren Korngröße von 110 µm bearbeitet.



Abbildung 2: Implantationsfertiges gestrahltes Verbundbauteil aus Metallschaum und Mg-CPC (Quelle: IFAM Dr Quadbeck)

2.3 Versuchsaufbau

Das Experiment wurde entsprechend den in der eigenen Arbeitsgruppe etablierten Methoden durchgeführt.

2.3.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden ausgewachsene weibliche Merino Schafe von ca. 70-80 kg und einem Alter von ca. ein bis zwei Jahren verwendet. Die Tiere stammten aus der Schafzucht Thomas Hoyler, Gut Hochmutting 1, 85764 Oberschleißheim, wo auch die Unterbringung der Versuchstiere erfolgte.

2.3.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden gemeinsam in einem separaten mit Stroh eingestreuten Stallabteil bzw. auf einer Weidefläche in der Herde untergebracht. Für die

Tierpflege waren Mitarbeiter der Schafzucht verantwortlich. Eine veterinärmedizinische Untersuchung der Schafe erfolgte in den ersten beiden Wochen post operationem täglich, später wöchentlich durch die betreuenden Tierärzte Dr. Korbinian Pieper und Hanns Manuel Zeus. Eine zusätzliche Gesundheitskontrolle erfolgte zweimal täglich durch Tierpfleger bzw. den Schäfer. Futter, bestehend aus Raufutter und Silage, wurde morgens und abends angeboten, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

2.3.3 Tierversuchsantrag und statistische Beurteilung

Die Tierversuche wurden in der Zeit von Oktober 2012 bis November 2013 unter Beachtung des Tierschutzgesetzes (TschG) durchgeführt. Das Versuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern unter der Versuchsnummer 55.2-1-54-2532-64-12 genehmigt. Zudem wurde ein statistisches Gutachten am Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor Prof. Dr. rer. nat. U. Mansmann) durchgeführt. Um bei einem Fehler erster Art von $\alpha=0,05$ eine Power von $1-\beta=0,8$ zu erreichen, werden pro Gruppe 10 Tiere benötigt.

2.3.4 Gruppeneinteilung der Tiere

Die insgesamt 30 Schafe wurden in drei Gruppen zu je 10 Tieren randomisiert, wobei jeder Gruppe zwei zusätzliche Reservetiere zugeordnet wurden. So ergaben sich zwei Implantatgruppen sowie eine Kontrollgruppe (Abb. 3). Die Kenntlichmachung der Versuchstiere erfolgte mittels Ohrmarken.

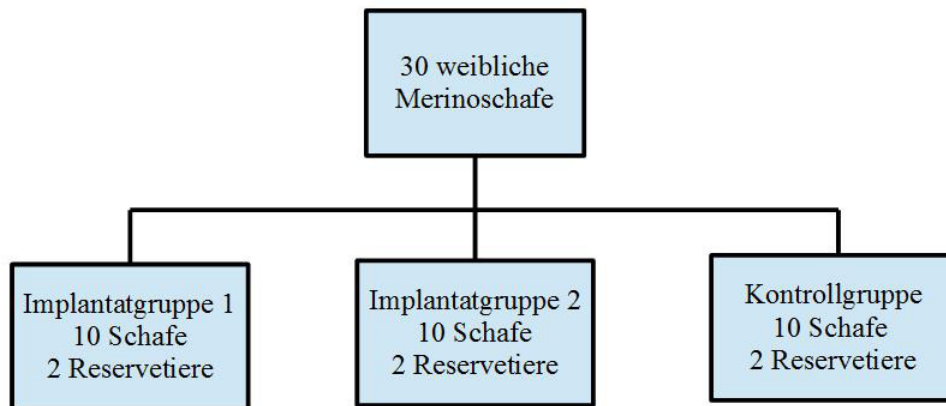


Abbildung 3: Gruppeneinteilung zu Beginn des Tierversuches

Die Tiere der Implantatgruppe 1 ($n=10$) erhielten im Rahmen des operativen Eingriffes eines der o.g. Implantate bestehend aus einer FeP-Legierung. Die Schafe der Implantatgruppe 2 ($n=10$) erhielten unter gleichen Bedingungen ein Implantat bestehend aus einer FePSi-Legierung. Bei den verbleibenden Tieren, welche der Kontrollgruppe ($n=10$) zugeordnet wurden, wurde die Osteotomie mit einer TPLO Platte der Firma Synthes® (Abb. 4) versorgt. Bei Erkrankung eines Versuchstiers oder bei insuffizienter Verankerung der Implantate wurden gemäß der Tierversuchsgenehmigung Ersatztiere hinzugezogen oder ein Gruppenwechsel der Schafe, z.B. in die Kontrollgruppe, vorgenommen. Die Versuchsdauer betrug jeweils 12 Monate bis zur Euthanasie.



Abbildung 4: TPLO Platte, Firma Synthes,
Quelle: us.synthesvet.com

2.4 Operationsmethode

2.4.1 Narkose und OP-Vorbereitung

36 Stunden vor dem Eingriff wurden die Tiere nüchtern gehalten, Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Um unnötigen Transportstress zu vermeiden, erfolgte die Versuchsdurchführung sowie die prä- und postoperative Unterbringung der Tiere auf dem Gelände des Schäfers Thomas Hoyler. Für den operativen Eingriff stand ein gefliester Raum mit OP-Bedingungen zur Verfügung.

Zu Beginn wurde eine Vordergliedmaße der Schafe rasiert und eine Venenverweilkanüle in die v. cephalica platziert. Zu diesem Zweck wurde das Gebiet um die Einstichstelle rasiert sowie desinfiziert. Initial wurden 0,3 mg/kg i.v. Midazolam (Dormicum[®], Roche Pharma AG, Grenzach, Deutschland) und 0,3 mg/kg i.v. Butorphanol (Torbugesic[®], Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) appliziert. Zusätzlich erhielten die Tiere zur Analgesie 40 mg/kg i.v. Metamizol (Novalgin[®], Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt, Deutschland) und 0,4 mg/kg s.c. Meloxicam (Metacam[®], Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland). Zur Narkoseeinleitung und um eine Intubationsfähigkeit zu erreichen, wurden 4-7 mg/kg i.v. Propofol (Narcofol[®], CP Pharma, Burgdorf, Deutschland) verabreicht und im Anschluss daran intubiert. Zur Narkoseaufrechterhaltung wurde eine Inhalationsanästhesie mittels Isofluran (Isofluran CP[®], CP Pharma, Burgdorf, Deutschland) und Sauerstoff durchgeführt. Um intraoperative Flüssigkeitsverluste auszugleichen, wurden die Versuchstiere mit einer isotonischen NaCl-Lösung infundiert. Die Überwachung der Vitalparameter während der Narkose erfolgte mittels Pulsoximeter, Kapnographen und EKG. Die Durchführung der Anästhesie oblag dem betreuenden Tierarzt Dr. med. vet. Pieper.

2.4.2 Operativer Eingriff

Nach der Narkotisierung der Tiere wurden diese in Seitenlage verbracht und das linke Hinterbein rasiert. Eine anschließende Desinfektion erfolgte mit Kodan Tinktur Forte (Fa. Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Das

Operationsgebiet wurde dann mit sterilen Einmalabdeckartikeln abgedeckt. Für die Durchführung der Operation waren ein steril gekleideter Operateur sowie ein Assistent anwesend. Nun folgte eine gerade ca. fünf bis sieben Zentimeter lange Inzision auf Höhe des medialen Tibiakopfes. Ein bis zwei Zentimeter unterhalb der Gelenkfläche wurde der Knochen mithilfe einer oszillierenden Säge subtotal osteotomiert. Die Kortikalis der gegenüberliegenden Seite blieb dabei bestehen. Der dadurch entstandene Spalt wurde im Anschluss mit einem Hintermann-Osteotomiesperrer geweitet, bis das keilförmige Implantat (Dicke 5mm) eingepasst werden konnte. Nach dem Entfernen des Osteotomiesperrers erlangte das Implantat durch die starke Elastizität des Knochens einen festen Sitz (Abb. 6). Anschließend wurden Periost und die darüber liegende Subcutis mit Einzelknopfteften und 2.0 Vicryl Fäden (Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Dem folgte die Naht der Haut. Zusätzlich wurde zur Beendigung des operativen Eingriffes, ein Pflastersprühverband (Nobecutan Spray, Fa. Astra, Wedel, Deutschland) auf die Wunde aufgebracht. Wie in 2.2.4. erwähnt, wurde bei den Tieren die der Kontrollgruppe angehörten, der Defekt mit einer TPLO Platte (Fa. Synthes, West Chester, Pennsylvania, USA) fixiert (Abb. 5). Die Operationsdauer betrug 30-45 Minuten. Zur Infektionsprophylaxe wurde allen in den Versuch eingeschlossenen Schafe unmittelbar präoperativ 2,2g i.v. Augmentan (Fa. SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland) per Kurzinfusion appliziert. Zur analgetischen Versorgung erhielten die Versuchstiere direkt post operationem, sowie sechs und 12 Stunden postoperativ 10µg/kg s.c. Buprenorphin (Temgesic®, Fa. Essex Pharma GmbH, München, Deutschland). Bei Anzeichen von Lahmheit und Schmerzäußerungen wie Zähneknirschen, Pressen gegen die Stallwand, Futterverweigerung und Lautäußerungen erfolgte eine weitere Schmerzmedikation nach Bedarf mit Novalgin und Metacam. Die Schafe konnten sich im Anschluss an den Eingriff frei in dem für sie vorgesehenen Gehege bzw. auf der Weide bewegen. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung. Als Abbruchkriterien für den Tierversuch wurden nicht beherrschbare lokale Infektionen, Allgemeinerkrankungen und Versagen der Implantate

festgelegt. Bei intra- oder postoperativen Unregelmäßigkeiten wie Frakturen oder gebrochenen Implantaten bestand die Möglichkeit, die Tiere der Kontrollgruppe zuzuordnen. Hierfür wurde der Defekt mit einer TPLO Platte versorgt. War dies nicht möglich, so wurden die Tiere infolge der nicht beherrschbaren Komplikationen (z.B. Fraktur in der Aufwachphase) euthanasiert.

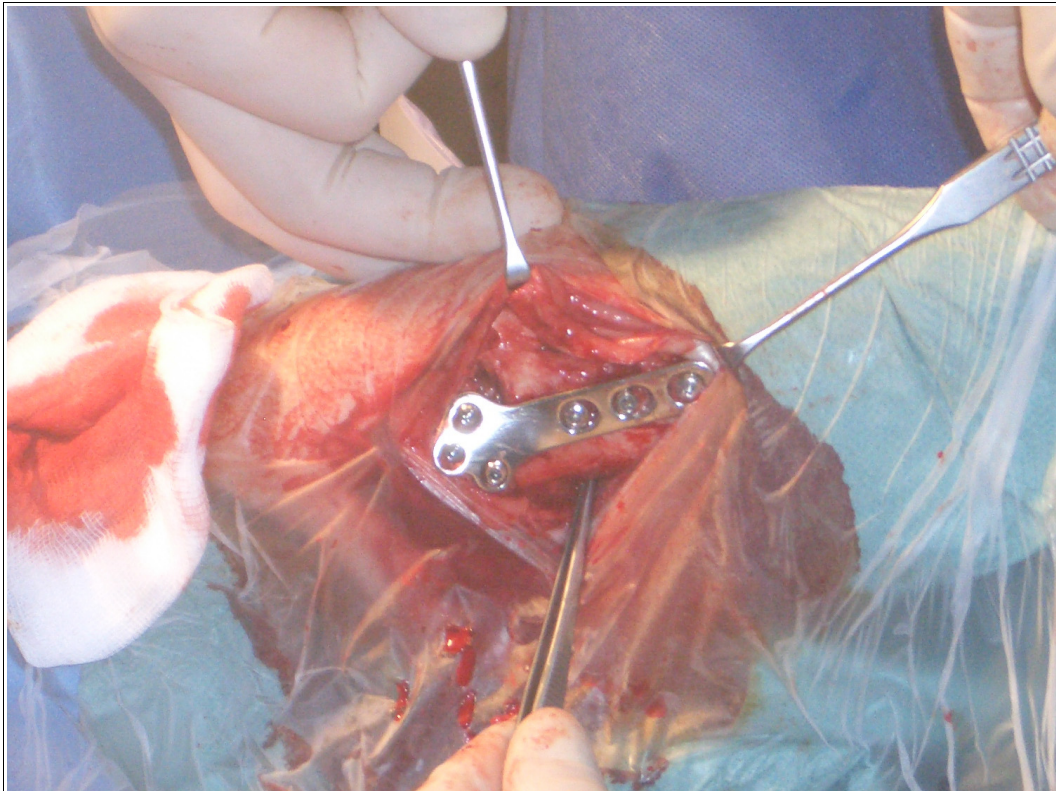


Abbildung 5: Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: intraoperativer Situs mit TPLO Platte, Tier der Kontrollgruppe

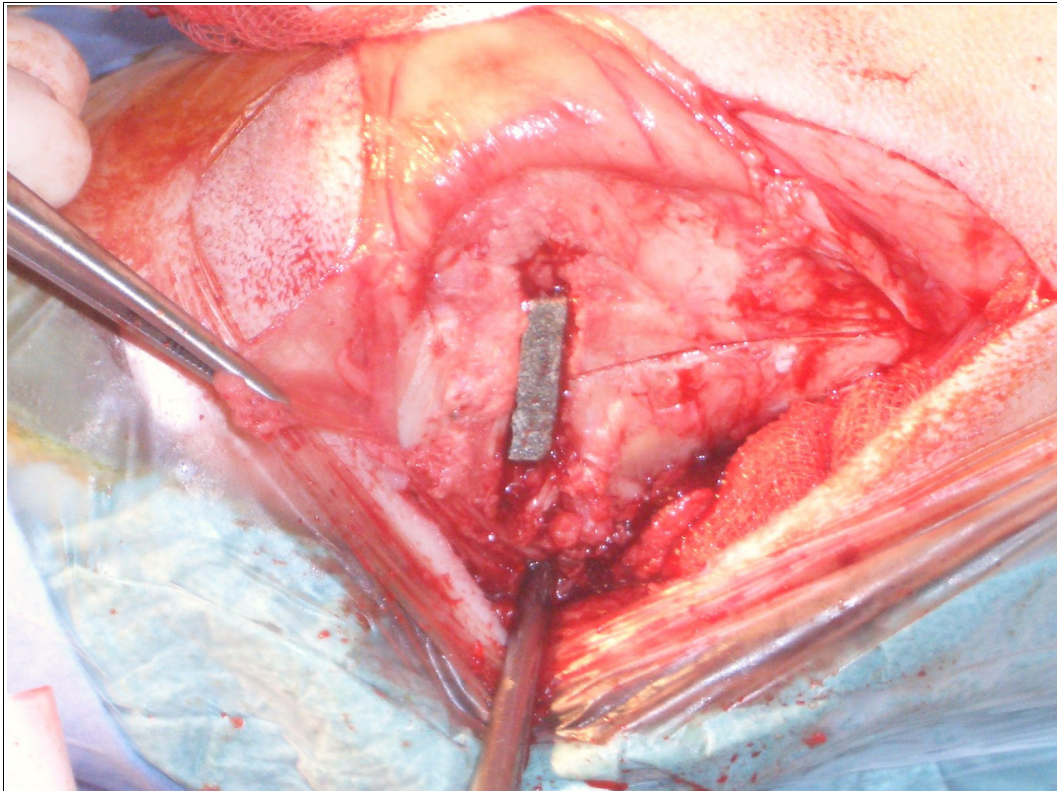


Abbildung 6: Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: intraoperativer Situs mit Implantat, Tier der Implantatgruppe 1

2.5 Euthanasie

Nach Beendigung des Versuchszeitraumes von 12 Monaten post operationem fand die Euthanasie der Schafe durch den betreuenden Tierarzt Dr. Korbinian Pieper mittels einer intravenösen Pentobarbitalinjektion (Narcoren® 16g/100ml, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) von 40ml statt. Die Durchführung erfolgte unmittelbar vor der Sektion der Tiere und fand im Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Mathias Ritzmann) statt.

2.6 Bildgebende Verfahren

2.6.1 Röntgenologische Untersuchung

Eine röntgenologische Untersuchung fand jeweils direkt post operationem sowie sechs und 12 Monate nach dem Eingriff statt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere von einem Assistenten fixiert. Die anschließenden Aufnahmen wurden durch den Versuchsleiter sowie den betreuenden Tierarzt vorgenommen. Alle beteiligten Personen waren mit Schutzkleidung und Dosimeter ausgestattet. Es wurde ein mobiles Röntgengerät (HF 400 ML, Fa. Gierth, Riesa, Deutschland) verwendet. Die belichteten Röntgenkassetten wurden daraufhin umgehend in die Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg) verbracht und dort digital entwickelt (Abb. 7 und Abb. 8). Die oben angegebenen Röntgenaufnahmen dienten der Überprüfung des korrekten Sitzes des Implantates sowie der Verlaufsdokumentation des Tierversuchs.

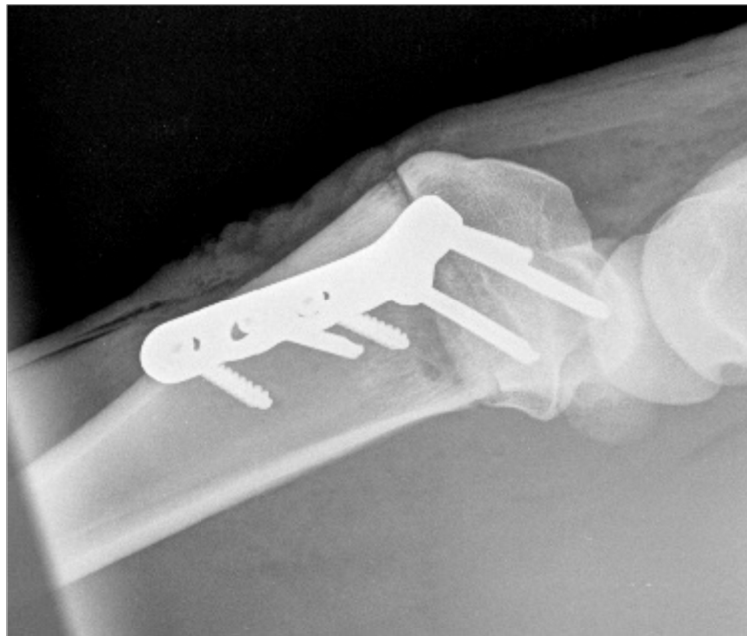


Abbildung 7: Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: p.op. Röntgenaufnahme, latero-lateraler Strahlengang, Tier der Kontrollgruppe mit TPLO Platte



Abbildung 8: Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: p.op. Röntgenaufnahme, latero-lateraler Strahlengang, Tier der Implantatgruppe 1

2.6.2 Computertomographie

Eine computertomographische Untersuchung wurde zu den Zeitpunkten 6 und 12 Monate post operationem durchgeführt. Die erste Untersuchung, zum Zeitpunkt 6 Monate post operationem, fand an der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Andrea Meyer-Lindenberg) unter der Leitung von Dr. med. vet. Korbinian Pieper statt. Als Computertomograph kam ein SOMATOM Definition AS (Fa. Siemens, München, Deutschland) zum Einsatz.

Die zweite Untersuchung wurde am Institut für klinische Radiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Maximilian Reiser, FACR, FRCR) unter der Leitung von PD Dr. med. Notohamiprodjo unter Verwendung eines SOMATOM Definition Flash CT-Scanners (Fa. Siemens, München, Deutschland) durchgeführt. Untersucht wurden ausschließlich die bereits grob in Form gesägten, in Alkohol eingelegten Tibiakopfpräparate zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem (Abb. 9). Die Aufnahmen dienten der klinischen Verlaufsdokumentation und makroskopischen Beurteilung.

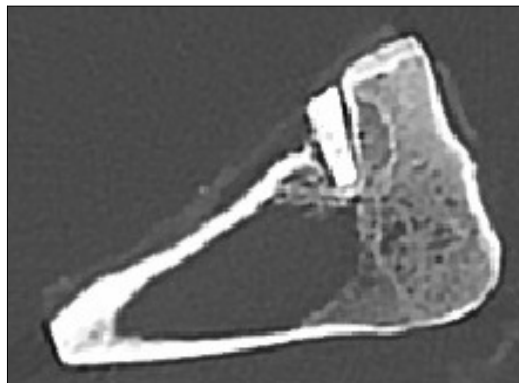


Abbildung 9: Schaf Tibiakopf, CT-Aufnahme 12 Monate p.op, Tier der Implantatgruppe 2, Longitudinalschnitt, Implantat als keilförmige Struktur zu erkennen

2.6.3 Kontaktradiographie

Nach der unter Punkt 2.7.3 beschriebenen Aufarbeitung der Präparate, wurden die MMA Schnitte in der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl II, Neuroanatomie (Direktor: Prof. Dr. med. C. Schmitz) unter der Anleitung und Kontrolle von Prof. Dr. Stefan Milz im kontaktradiographischen Verfahren untersucht. Hierfür wurden die Schnitte direkt auf einen Agfa-Strukturix Röntgenfilm gelegt und in einem cabinet x-Ray System-Faxitron (Fa. Hewlett Packard, McMinnville, Oregon, USA) bei einer Röhrenspannung von 18 kv für 30 Sekunden belichtet (Abb. 10). Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte voll automatisiert. Die daraus entstandenen Bildsequenzen wurden im Anschluss hochauflösend digitalisiert und optisch erfasst.

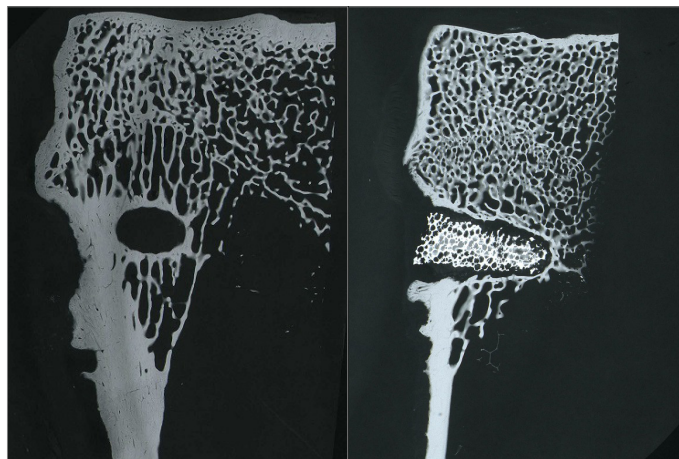


Abbildung 10: Schaf, Tibia, kontaktradiographische Aufnahme, MMA Schliff, Tier der Kontrollgruppe (links), Tier der Implantatgruppe 1 (rechts)

2.7 Histopathologische Aufarbeitung der entnommenen Proben

2.7.1 Organentnahme und Sektion der Versuchstiere

Die Sektion sowie die Organentnahme der Tiere erfolgte im Institut für

Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Mathias Ritzmann). Wurde nach der Euthanasie der Tod der Tiere durch den Tierarzt Dr. Korbinian Pieper festgestellt, erfolgte die vollständige Sektion sowie die Probenentnahme durch einen Tierpathologen des Institutes für Tierpathologie. Neben einer makroskopischen Beurteilung wurden Proben aus dem Herzen, der Leber, den Nieren, der Milz, der Lunge, dem Gehirn sowie den tributären Lymphknoten *ln. popliteus* und *ln. iliofemoralis* entnommen. Die Gewebeproben wurden umgehend in Formalin fixiert. Im Anschluss folgte die Präparation des linken Tibiakopfes. Nachdem die Präparate sorgfältig von umgebender Muskulatur und Bindegewebe befreit worden waren, erfolgte eine Reduktion auf die im Tierversuch osteotomierte Region mithilfe einer Fleischereibandsäge. Hierauf wurden die Knochenproben umgehend in Ethanol 96% fixiert, um sie für die weiteren Untersuchungen vorzubereiten.

2.7.2 Histopathologische Aufarbeitung und Beurteilung der Organproben

Die histopathologische Aufarbeitung und Untersuchung fand im Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Mathias Ritzmann) unter der Anleitung von Dr. M. Leipzig und Dr. M. Ch. Langenmayer

Nach der Entnahme wurden die ca. 1cm x 1cm großen Organproben bei Raumtemperatur in eine wässrige, gepufferte Formalinlösung 10% verbracht. Darin verblieben diese mehrere Stunden bis zur vollständigen Fixierung. Im Anschluss daran wurden die Proben zunächst mit Leitungswasser gespült und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol (Fa. W. Gräen GmbH & Co, München, Deutschland) entwässert. Dem folgte das Einbetten in heißes Paraffin (Fa. Sherwood Medical, St. Louis, USA). Um nach dem Abkühlen die histologischen Schnitte anzufertigen, kam ein Rotationsmikrotom (HM 315, Mikrom, Fa. Walldorf, Deutschland) zum Einsatz.

Anschließend wurden die Schnitte auf einen Objektträger (Engelbrecht, Deutschland) aufgebracht und durch Trocknung für das Färben vorbereitet. Die

einzelnen Arbeitsschritte wurden anhand etablierter Färbeprotokolle durchgeführt. Als Übersichtsfärbung kam eine Hämaulaun-Eosin Färbung zum Einsatz. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte 10 Minuten in Xylol (Fa. W. Gräen GmbH & Co, München, Deutschland) entparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt. Die Proben wurden dann fünf Minuten lang in Mayer's Hämaulaun Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt und anschließend weitere fünf Minuten warm gewässert. Zur Differenzierung wurden die Präparate 2-5 mal in HCl-Alkohol 0,5% getaucht und daraufhin erneut gewässert. Dem folgte das zweiminütige Färben in Eosinlösung 1%. Hierfür wurden 10g Eosin gelblich (Fa. Applichem., Darmstadt, Deutschland) in 1000ml heissem aqua dest. gelöst, anschließend filtriert und mit 1,5ml Eisessig (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) vermischt. Die Schnitte wurden dann in destilliertem Wasser gespült und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol (Fa. W. Gräen GmbH & Co, München, Deutschland) wieder entwässert. Danach folgte das Eindecken mit Histokitt. Um zwei- sowie dreiwertiges Eisen nachweisen zu können, kam die Färbung Turnbullblau nach Quincke zum Einsatz. Hierfür wurden die Schnitte auf einen mit Silan beschichteten Objektträger (Star Frost, Engelbrecht, Deutschland) aufgezogen. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, wurden ausschließlich Kunststoffpinzetten verwendet. Die Proben wurden 10 Minuten in Xylol (Fa. W. Gräen GmbH & Co, München, Deutschland) entparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt. Diese wurden dann eine Stunde in Ammoniumsulfidlösung 10% (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) verbracht und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Dem folgte ein zehnminütiges Färben in Kaliumhexacyanoferrat 10% (Fa. AppliChem., Darmstadt, Deutschland) und ein erneutes Spülen in destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden dann weitere fünf Minuten in Kernechtrot 0,1% (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt, wiederum gespült und im Anschluss daran mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol (Fa. W. Gräen GmbH & Co, München, Deutschland) entwässert. Die Proben wurden dann in Histokitt

eingedeckt und bis zur Auswertung lichtgeschützt gelagert.

2.7.3 Histopathologische Aufarbeitung und Beurteilung der Tibiakopfpräparate

Die histopathologische Aufarbeitung und Untersuchung der Knochenproben und der Implantate fand in der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl II, Neuroanatomie, (Direktor: Prof. Dr. med. C. Schmitz) unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Milz statt.

Zu Beginn wurden die entnommen Knochenpräparate an einer Bandsäge mit Diamantsägeblatt (Cut-grinder, Fa. patho-service GmbH, Oststeinbek, Deutschland) grob in Form gesägt und anschließend über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Im Anschluss daran wurden von allen Präparaten drei ca. 2,0x1,0x0,5cm große Proben entnommen und für die weitere Bearbeitung in Methylmethacrylat (MMA, Methacrylsäuremethylester) eingebettet. Nach dem vollständigen Aushärten des MMA wurden von jedem Block mithilfe einer Innenlochsäge (SP1600, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) ca. 200µm dicke Scheiben angefertigt. Diese wurden zunächst wie unter Punkt 2.6.3 beschrieben geröntgt und im Anschluss auf Kunststoffobjektträger der Firma Exakt advanced technologies GmbH (Norderstedt, Deutschland) aufgebracht. Hierfür wurden die Schnitte mit einem Sekundenkleber (Cyanolit 201, Fa. Bürklin, Oberhaching, Deutschland) bestrichen und blasenfrei auf den Objektträger aufgebracht. Im Anschluss wurde der beschickte Objektträger zwischen zwei Teflon- sowie zwei Metallplatten gelegt und für ca. 20 Minuten in einen Schraubstock gepresst. Nach der Entnahme wurden die aufgeklebten Schnitte an einem Mikroschleifgerät Exakt 400 CS, (Fa. Exakt advanced technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit Hermes P800 Schleifpapier (Fa. Hermes, Hamburg, Deutschland) plan und dünn (bis zum Verschwinden der Riefen) geschliffen und in einem zweiten Arbeitsschritt mit Hermes P 2500 Schleifpapier (Fa. Hermes, Hamburg, Deutschland) spiegelblank poliert. Die erste Serie der MMA Schnitte wurde mit Giemsa-Eosin gefärbt.

Hierfür wurde mittels einer Pipette Giemsalösung (Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf die Schnitte aufgebracht und diese 30 Minuten lang bei 60°C in eine feuchte Kammer verbracht. Im Anschluss daran, wurden die Proben kurz in Essigsäure 0,1% getaucht und in destilliertem Wasser gespült. Im zweiten Schritt wurde auf die Schnitte Eosinlösung 0,1% sowie ein Tropfen Eisessig aufgebracht. Nach vier Minuten wurden die Proben in destilliertem Wasser gespült und wenn nötig zur Differenzierung kurz in Ethanol 90% getaucht. Um III-wertige Eisenionen nachweisen zu können, wurde die zweite Schnittserie mit Berliner Blau und Kernechtrot (Fa. Chroma, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) gefärbt. Die Oberfläche der MMA-Schnitte wurde nicht wie üblich mit Ameisensäure angeätzt, da Erfahrungen aus Vorversuchen gezeigt hatten, dass die Ameisensäure mit dem Metallimplantat oxidativ reagiert und so die Ergebnisse verfälscht werden könnten. Die Proben wurden mit einer Lösung aus 50%-igem Ferrocyankalium sowie 1%-iger Salzsäure übergossen und für 30 Minuten bei 30°C in eine feuchte Kammer verbracht. Im Anschluss daran wurden die Proben in destilliertem Wasser gespült und für eine Minute in ein Bad aus Kernechtrot (Fa. Chroma, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) gegeben. Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser konnten die Proben getrocknet werden. Die Lagerung erfolgte verschlossen, vor UV-Strahlung geschützt. Bei Präparaten, die Unregelmäßigkeiten wie z.B. entzündliche Veränderungen aufwiesen, wurden zusätzliche Proben entnommen und zur genaueren Differenzierung mit Hämalun und Eosin gefärbt.

Die Auswertung der Proben erfolgte unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Milz. Hierfür wurden die gefärbten Schnitte zunächst mit einem Durchlichtmikroskop (Axiophot, Fa. Carl Zeiss GmbH, München, Deutschland) begutachtet und zur weiteren Auswertung fotografiert. Um den Anteil des noch vorhandenen Knochenzementes an der Gesamtfläche des Implantates im Schnitt zu ermitteln, wurden mithilfe der Software Zeiss AxioVision Rel. 4.8 beide Flächen manuell markiert und im Anschluss wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben berechnet. Die weitere statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS 21 (Fa. IBM,

Armonk, New York, USA).

2.7.4 Statistische Methodik für die histopathologischen Befunde

Um die vorliegenden Daten auf Normalverteilung zu testen, wurden Q-Q Plots über die Gesamtheit der Daten sowie über die einzelnen Gruppen angefertigt und beurteilt. Die Ergebnisse zeigten keine Normalverteilung. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auf eine Testung mittels Kolmogorov-Smirnow-Test verzichtet. Für die weitere Beurteilung der Daten kamen ausschließlich non-parametrische Tests zum Einsatz. Zu Beginn wurde der Kruskal-Wallis-Test für k-unabhängige Stichproben (SPSS 21) verwendet, um zu überprüfen, ob alle Parameter aus einer Grundgesamtheit stammten. Bei Signifikanzen bzw. Ablehnung der Nullhypothese (die Lageparameter sind in allen Gruppen gleich) erfolgte eine gezielte Testung mittels Mann-Whitney-U-Test (SPSS 21), der einen Vergleich von Lageparametern zweier Gruppen ermöglicht. Die Festlegung der Irrtumswahrscheinlichkeit erfolgte auf 5%. Zu Beginn der statistischen Auswertungen erfolgte eine Beratung durch Frau Dr. Eva Hoster, Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. U. Mansmann).

Die statistische Auswertung der entzündlichen Veränderungen der entnommenen Organproben (Abb. 29 und Abb. 30) erfolgte anhand eines, im Rahmen dieser Dissertation erstellten Scores:

Entzündliche Veränderungen:

- I. 0-9% entzündliche Veränderungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes
- II. 10-25% entzündliche Veränderungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes
- III. 26-50% entzündliche Veränderungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes

- IV. > 50% entzündliche Veränderungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes

Eisenablagerungen:

Um die intra- und extrazellulären Eisenablagerungen (Abb. 25, Abb. 26 und Abb. 27) statistisch auswerten zu können, wurde wie für die entzündlichen Veränderungen ein semiquantitativer Score erstellt.

- I. 0-9% Eisenablagerungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes
- II. 10-19% Eisenablagerungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes
- III. 20-30% Eisenablagerungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes
- IV. > 30% Eisenablagerungen innerhalb eines repräsentativen Gesichtsfeldes

2.8 Laborwerterhebung und Auswertung

2.8.1 Blutprobenentnahme

Die Blutprobenentnahme erfolgte bei allen Tieren postoperativ sowie nach sechs und zwölf Monaten, um Veränderungen der alkalischen Phosphatase-, Phosphor-, Eisen- und Ferritinwerte sowie Veränderungen des Differentialblutbildes aufzuzeichnen. Hierfür wurden die Schafe durch einen Assistenten im Stehen am Hals fixiert. Die Entnahme erfolgte an der v. jugularis externa. Dabei kam eine Safety-Kanüle (0,9x38mm) der Firma Sarstedt, Norderstedt Deutschland zum Einsatz. Als Probengefäße wurden jeweils eine Serum-Monovette (Sarstedt REF 05.1104 – 4,5 ml) und eine EDTA-Monovette (Sarstedt REF 05.1167 – 2,7 ml) verwendet. Nach der Blutentnahme wurden die Probenröhrchen mit der entsprechenden Ohrmarkennummer versehen und umgehend in die Medizinische Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand: Prof.

Dr. med. vet. Karin Hartmann) verbracht und auf die oben genannten Parameter untersucht.

2.8.2 Aufarbeitung der Blutproben

Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte an der Medizinischen Kleintierklinik der Universität München (Klinikleitung: Prof. Dr. Karin Hartmann). Hier erfolgten unter Leitung von Frau Dr. Karin Weber die weiteren Untersuchungen.

2.8.3 Statistische Methodik für die Laborbefunde

Um die vorliegenden Daten auf Normalverteilung zu testen, wurden Q-Q Plots über die Gesamtheit der Daten sowie über die einzelnen Gruppen angefertigt und beurteilt. Die Ergebnisse zeigen keine Normalverteilung. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auf eine Testung mittels Kolmogorov-Smirnow-Test verzichtet. Für die weitere Beurteilung der Daten kamen ausschließlich non-parametrische Tests zum Einsatz. Zu Beginn wurde der Kruskal-Wallis-Test für k-unabhängige Stichproben (SPSS 21) verwendet, um zu überprüfen, ob alle Laborparameter aus einer Grundgesamtheit stammen. Bei Signifikanzen bzw. Ablehnung der Nullhypothese (die Lageparameter sind in allen Gruppen gleich) erfolgte eine gezielte Testung mittels Mann-Whitney-U-Test (SPSS 21), der einen Vergleich von Lageparametern zweier Gruppen ermöglicht. Die Festlegung der Irrtumswahrscheinlichkeit erfolgte auf 5%.

3 Ergebnisse

3.1 Verlauf des Tierversuchs

3.1.1 Mortalität, Erkrankungen und Gruppenwechsel der Versuchstiere

Im Verlauf des Tierversuchs verstarben insgesamt vier Tiere. Drei Schafe mussten intraoperativ bzw. in der Aufwachphase euthanasiert werden. Grund hierfür waren in allen Fällen Frakturen des Tibiakopfes durch unkontrollierbares Fluchtverhalten der Tiere, mit konsekutiver Überbelastung. Für ein intraoperativ verstorbenes Schaf kam ein Reservetier zum Einsatz. Ein weiteres Versuchstier verstarb fünf Monate post OP mit Verdacht auf Pneumonie. Eine Obduktion wurde nicht durchgeführt. Aufgrund einer zu großen Osteotomie wurde das ursprünglich einer Implantatgruppe zugehörige Schaf mit der Nummer 44219 der Kontrollgruppe zugeordnet. Im weiteren Verlauf kam es zu keiner Instabilität der Osteosynthesen.

3.1.2 Endgültige Gruppeneinteilung

Nach dem oben aufgeführten Tod und dem Gruppenwechsel einiger Versuchstiere ergab sich folgende Gruppeneinteilung (Abb. 11):

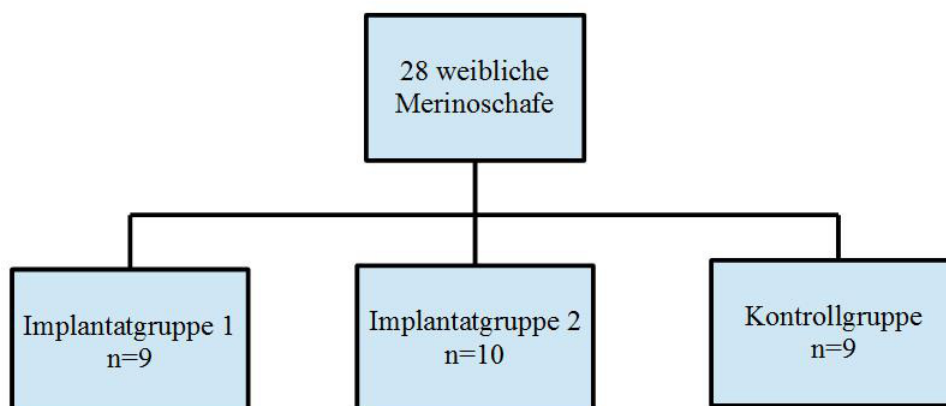


Abbildung 11: finale Gruppeneinteilung

3.2 Makroskopische Beurteilung

Bei der makroskopischen Beurteilung der durch Sägen zugetrimmten Tibiakopfpräparate waren die Implantate deutlich erkennbar. Auch deren keilförmige Struktur war weitestgehend erhalten. Die Implantate (Abb. 12 und Abb. 13) waren ihrerseits von einem braunen Randsaum mit teils körniger Struktur umgeben (1). Ähnliche Strukturen fanden sich auch im angrenzenden Markraum wieder. Im Zentrum des Implantates zeichnete sich eine scharf begrenzte, hellgrau bis weiße Masse (2) ab, die teilweise von einem bräunlichen Rand (3) umgeben war. Bei einem Tier zeigte sich eine starke und ausgedehnte Rotfärbung im Markraum um das Implantat. Die Präparate der Kontrollgruppe zeigten makroskopisch gesunden Knochen.



Abbildung 12: Schaf Tibia, Nativschnitt FePSi-Implantat, 12 Monate p.op (Erklärung siehe Text)



Abbildung 13: Schaf Tibia, Nativschnitt FeP-Implantat 12 Monate p. op. (Erklärung siehe Text)

3.3 Histopathologische Ergebnisse

3.3.1 Mikroskopische Auswertungen der Tibiakopfpräparate

Die quer zu ihrer Längsachse geschnittenen Implantate wurden zu Beginn der histologischen Auswertung in drei ROI's (Region of interest) eingeteilt, die je nach Färbung und Probe mehr oder weniger deutlich darstellbar waren:

- *ROI 1 Zentralpartie: Zement- sowie Metallstruktur erhalten.*
- *ROI 2 Übergangszone: Scharf zur Zentralpartie abgegrenzter Bereich. Deutliche Zeichen der Degradation des Zements vorhanden. Metallstruktur überwiegend unverändert.*
- *ROI 3 Randpartie: Keine Zementstruktur erkennbar, beginnende Degradation der Metallstege.*

Die drei ROI's wurden anhand der gefärbten und fotografierten MMA Schliffe mit Hilfe der Software Zeiss AxioVison Rel. 4.8 ausgewertet. Die Einteilung der Zentralpartie erfolgte durch eine zentrale Längsachse. Übergangszone und

11.3 mm

1.11 mm

1.23 mm

0.6 mm

1.85 mm

2 mm

Abbildung 14: Schaf, Tibia, MMA Schliff, Giemsa Eosin Färbung, metrische Einteilung der ROI's anhand der Zentralachse, Tier der Implantatgruppe 1

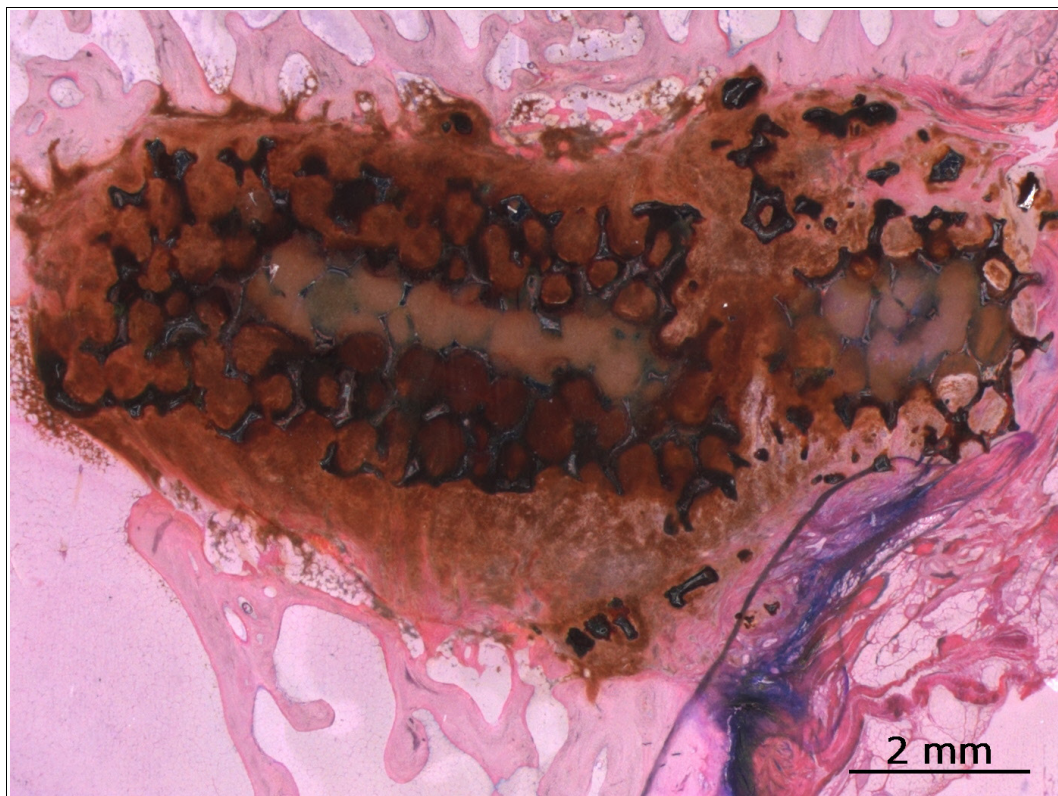


Abbildung 15: Schaf, Tibia, MMA Schliff, Giemsa Eosin Färbung, Implantat mit zweigeteilten ROI's, Tier der Implantatgruppe 2

Giemsa Eosin Färbung:

Bei der Auswertung der Giemsa Eosin gefärbten Schnitte der beiden Implantatgruppen fiel zunächst eine braune Substanz, angrenzend an die Randzone auf, von der die Implantate umgeben waren. Das metallische Implantatmaterial war bei der Mehrzahl der Proben noch fast vollständig vorhanden. Jedoch waren bei sämtlichen Implantaten Zeichen der Degradation erkennbar, die unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Diese reichten von einem kaum sichtbaren Abbau bis hin zu einer beginnenden Auflösung des Implantates. Speziell um die Randpartie war der Abbau deutlich erkennbar. Als Zeichen der Degradation wurde die Verfärbung durch Korrosion sowie das sich Verjüngen der Metallstege, das Schwinden von Zement in den porenförmigen Strukturen und die Ansammlung von Degradationsprodukten definiert. Die die Implantate umgebende braune Substanz ist vermutlich letzteren zuzuordnen. Überdies

konnten in allen Fällen die Bildung einer bindegewebigen Kapsel sowie in einem Fall (Abb. 16) eine beginnende Knochenneubildung (färberisches Verhalten) in der Übergangszone des Implantates festgestellt werden.



Abbildung 16: Schaf, Tibia, MMA Schliff, Tier der Implantatgruppe 1, Giemsa Eosin Färbung, Knochenneubildung im Zentrum des Implantates

Entzündliche Veränderungen, wie zelluläre Infiltration des Markraumes sowie ein gehäuftes Vorkommen von Granulozyten und Makrophagen wurden in einer Probe (Abb. 17-20) beobachtet. Auffällig war hierbei, dass sich sowohl in der Entzündungszone als auch außerhalb im Fettmark Anzeichen von zellgebundenem Fremdmaterial fanden. Hierbei handelte es sich entweder um Abbauprodukte des Implantates oder um Resorptionsprodukte, die aus der Entzündungszone stammen (z.B. Zelldetritus).



Abbildung 17: Schaf, Tibia, Nativschnitt, dunkelroter Randsaum zwischen Implantat und rotem Knochenmark spricht für ein entzündliches Geschehen, Tier der Implantatgruppe 2

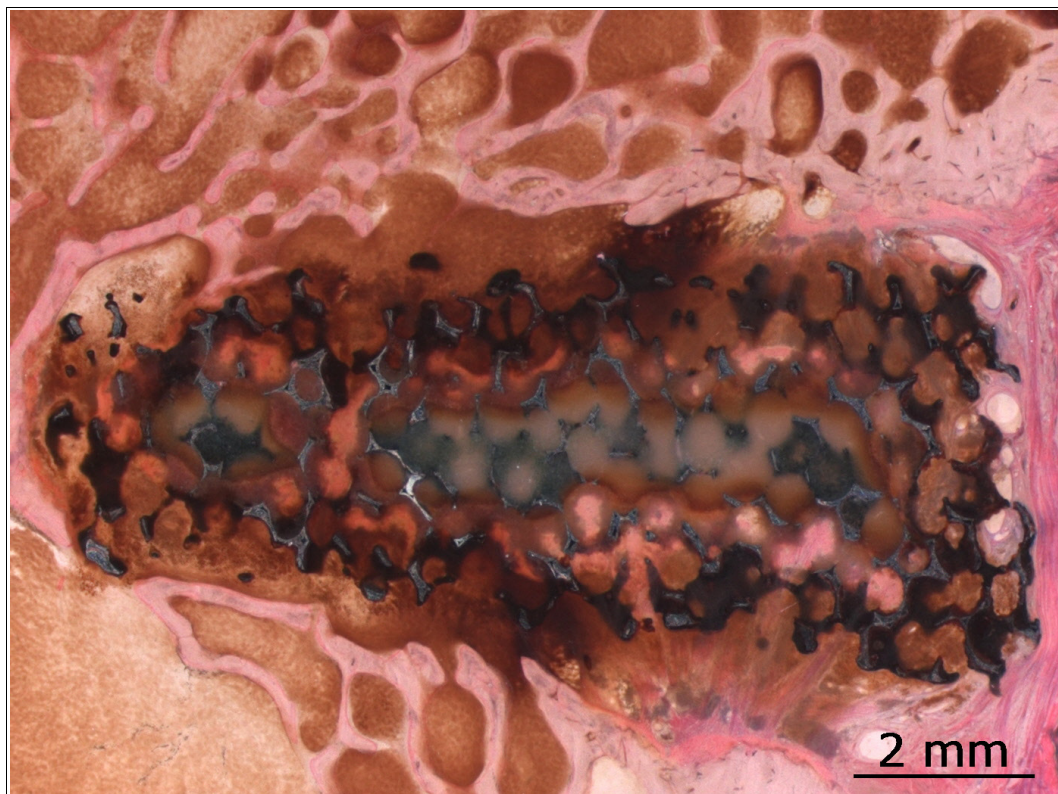


Abbildung 18: MMA Schliff, Giemsa Eosin Färbung, Implantatgruppe 2, Hinweis auf entzündliche Reaktion im Implantat nahen Markraum

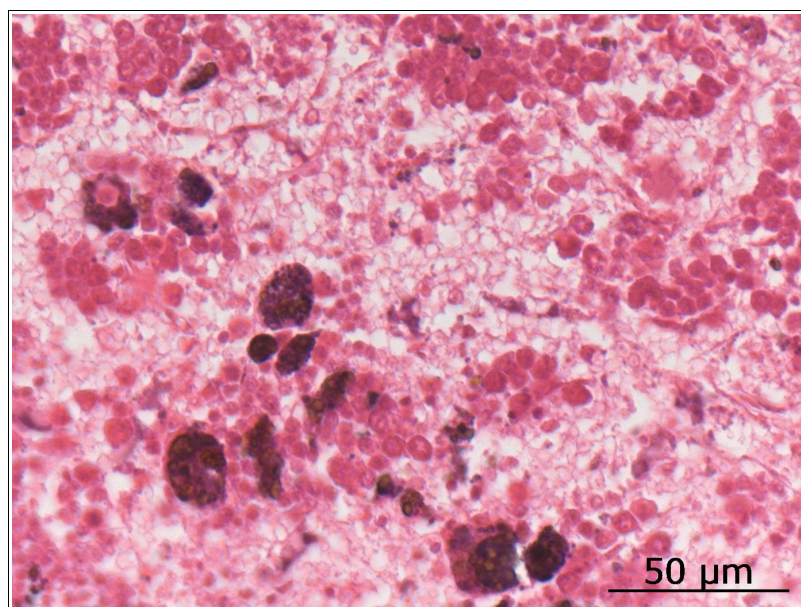


Abbildung 19: Schaf Tibia, Paraffinschnitt, Implantatgruppe 2, HE Färbung. Zeichen von zellgebundenem Fremdmaterial in der Entzündungszone

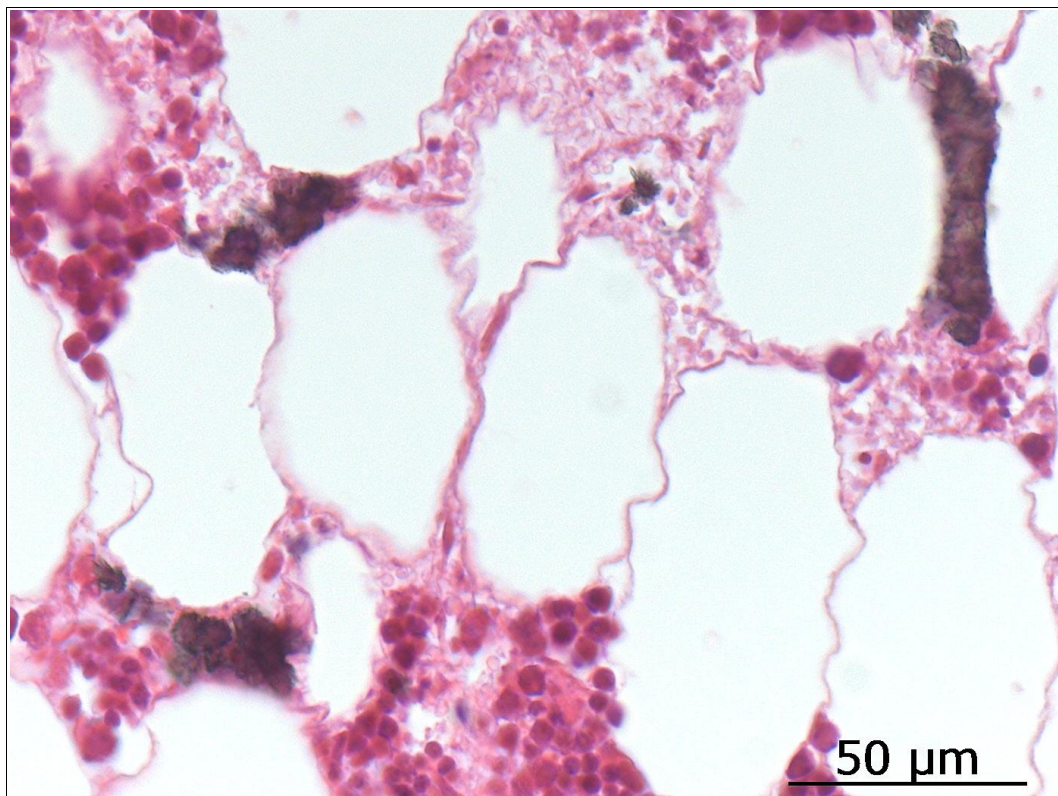


Abbildung 20: Schaf Tibia, Paraffinschnitt, Implantatgruppe 2, HE Färbung: Zellgebundenes Fremdmaterial im Fettmark, außerhalb der Entzündungszone

Mg-CP-Zement:

Die Zementfüllung stellte sich im Bereich der Zentralpartie als kompakte, meist homogene Masse dar, die sich in der Übergangszone immer weiter löchrig zersetzte und in der Randpartie nicht mehr in ihrer ursprünglichen Form erkennbar war. Der Übergang von der Zentralpartie zur Übergangszone ließ sich scharf durch eine braune schmal umlaufende Struktur abgrenzen.

Metallisches Implantatmaterial:

Im Bereich der Zentralpartie erschienen die eisenbasierten Strukturen metallisch glänzend mit scharf abgegrenzten Rändern. In der Übergangszone waren erste Farbabweichungen sichtbar, zudem wirkten die Ränder der Metallstege weniger scharf begrenzt. In der Randpartie stellten sich die metallischen Strukturen mit unscharfen Rändern sowie deutlichen braunen bis schwarzen Farbveränderungen

dar.

Berliner Blau Reaktion:

Bei der Auswertung der Schnitte der Implantatgruppen nach erfolgter Berliner Blau Reaktion fiel die oben beschriebene braune Masse auf, von der die Implantate umgeben waren (Abb. 21). Die Zentralpartie (1) bestand aus einer kräftig blau gefärbten kompakten Struktur und ließ sich weniger deutlich von der Übergangszone abgrenzen als bei den Giemsa Eosin gefärbten Präparaten. Eine deutliche Blaufärbung zeigten auch die an die Zentralpartie angrenzenden Metallstege (2).

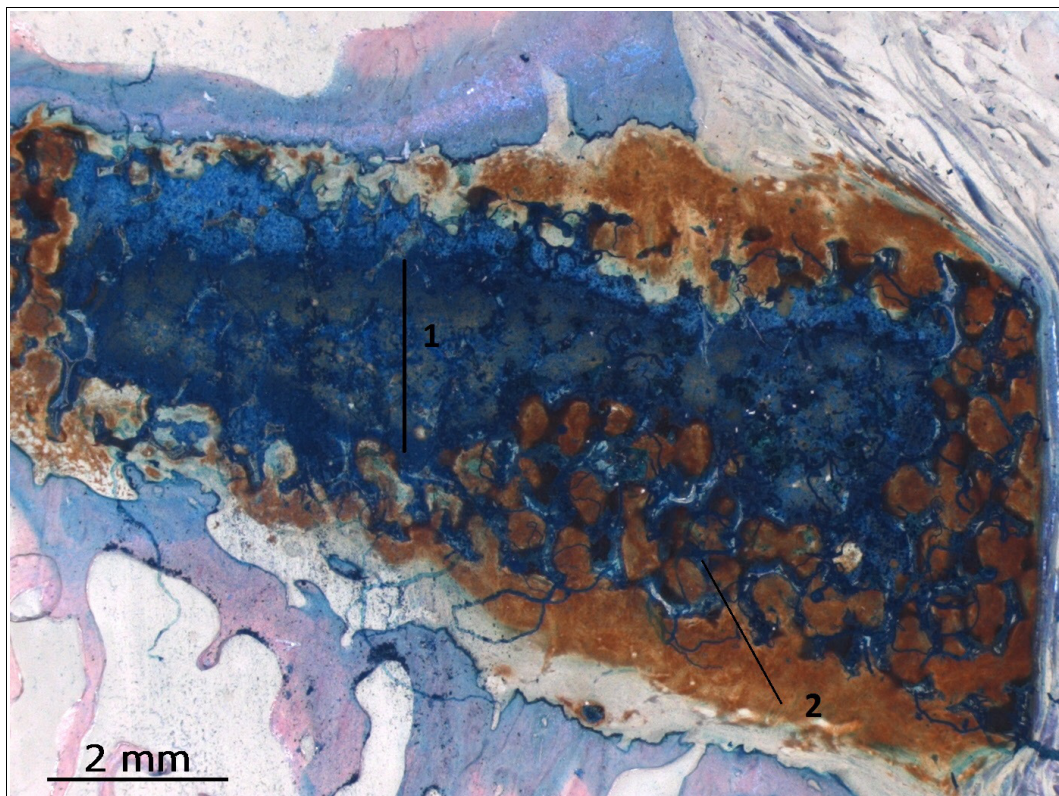


Abbildung 21: Schaf Tibia, MMA Schliff. Berliner Blau Reaktion, Implantatgruppe 1 (Erklärung siehe Text)

Bei der Berliner Blau Reaktion waren deutliche Zeichen der Resorption von Zement und Metall in Randpartie und Übergangszone zu erkennen. Besonders auffällig waren mit blauer Farbe angereicherte, tubuläre Strukturen, die der

Zentralpartie zu entspringen schienen (1). Diese Kanäle verliefen meanderförmig durch das Implantat in die angrenzenden bindegewebigen bzw. knöchernen Strukturen. Mit einem anfänglichen Durchmesser von durchschnittlich 0,13 mm verzögerten sich die Tubuli bis zu ihrem vollständigen Verschwinden. Teilweise entstand der Eindruck, dass von einzelnen Kanälen wurzelartige Verzweigungen abführten. Besonders deutlich zeigt dies der Schnitt eines Implantates im äußeren Randbereich, in dem sich ausschließlich Übergangszone und Randpartie darstellen (Abb. 22). Eine weitere Struktur, die sich nur in der Berliner Blau Reaktion deutlich zeigte, ist eine schmale blaue Linie (2), die das Implantatbett nach lateral umgibt und rein optisch eine Grenze zum umliegenden Knochen darstellt. Nach lateral an diesen Bereich angrenzend fanden sich nur wenige bis gar keine Fe^{3+} positiven Strukturen.

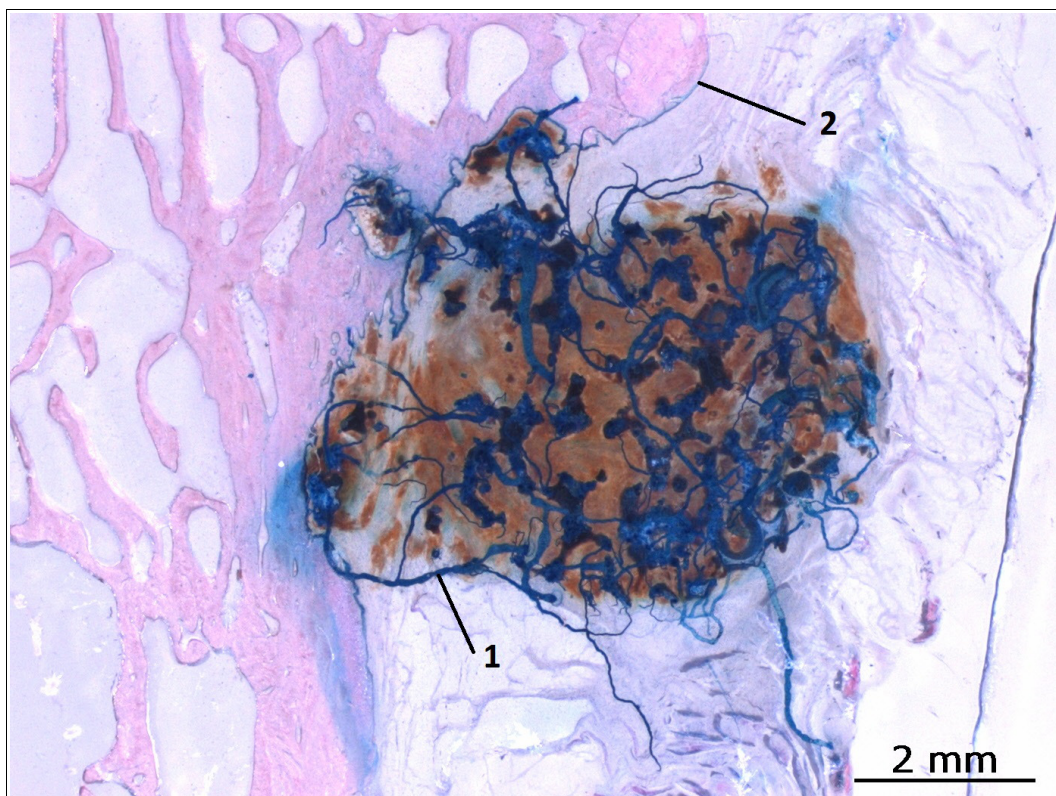


Abbildung 22: Schaf Tibia, MMA Schliiff, Implantatgruppe 2, Berliner Blau Reaktion, Übergangszone und Randpartie mit Fe^{3+} -haltigen tubulären Strukturen (1) und blaugefärbter knochenseitiger Umrandung (2).

Die mikroskopische Auswertung beider Färbungen der Kontrollgruppe ergab keine histopathologischen Besonderheiten (Abb. 23). Die Präparate zeigten unveränderten Knochen.

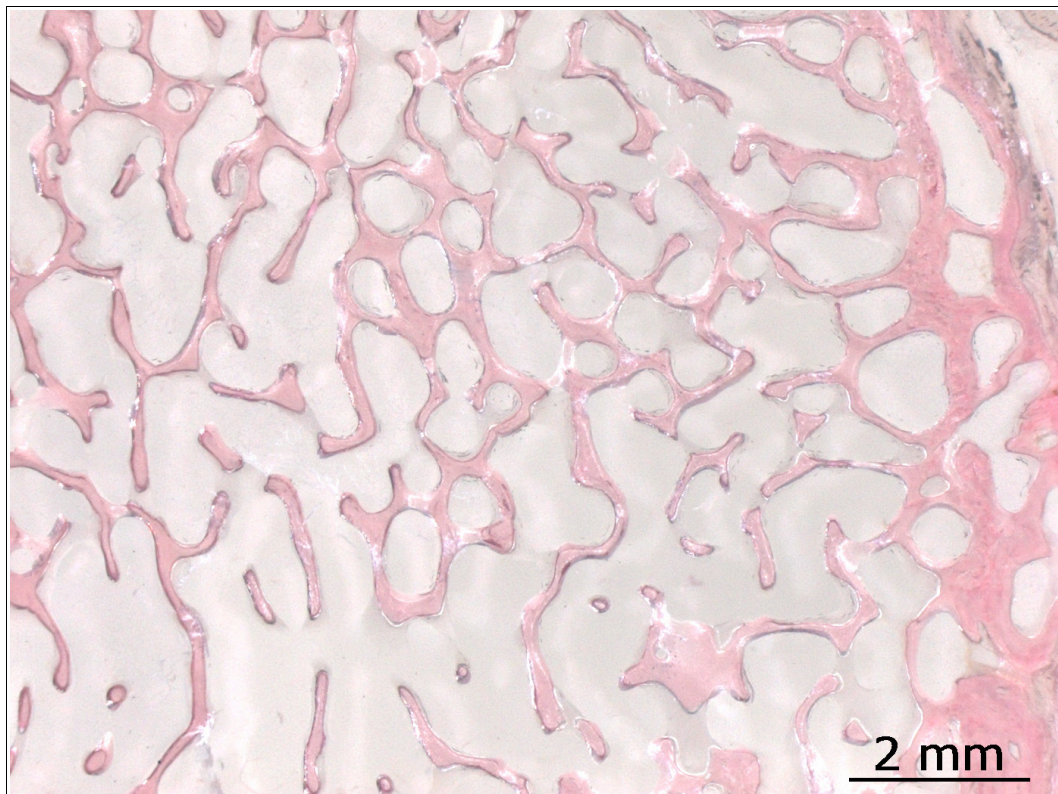


Abbildung 23: Schaf Tibia, MMA Schliff, Berliner Blau - Eosin Färbung, Tier der Kontrollgruppe, Spongiosa mit unverändertem Knochen, kein Eisen nachweisbar

Zementresorption:

Um ein Maß für den Abbau des Knochenzements nach einem Jahr zu erhalten, wurde die relative Zementresorption bestimmt (Tab. 1). Hierfür wurden anhand der MMA Schliffe die Fläche des Implantates sowie die des nicht resorbierten Zementes (inklusive der darin eingebetteten Metallimplantatanteile) ermittelt und anhand der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Resorption in \%} = \frac{\text{Fläche nicht resorbierter Zement} * 100}{\text{Fläche des Implantates}}$$

Die Berechnungen ergaben einen Mittelwert von 80,4% Zementresorption beider

Implantatgruppen. Für die Implantatgruppe 1 (FeP) ergab sich ein Wert von 85,1%, für die Implantatgruppe 2 (FePSi) ein Wert von 76,1% (Abb. 24).

Implantatgruppe	Mittelwert	N	Standardabweichung
1	85,1%	9	18,7
2	76,1%	10	18,6
Insgesamt	80,4%	19	18,7

Tabelle 1: Übersicht der Zementresorption in Prozent

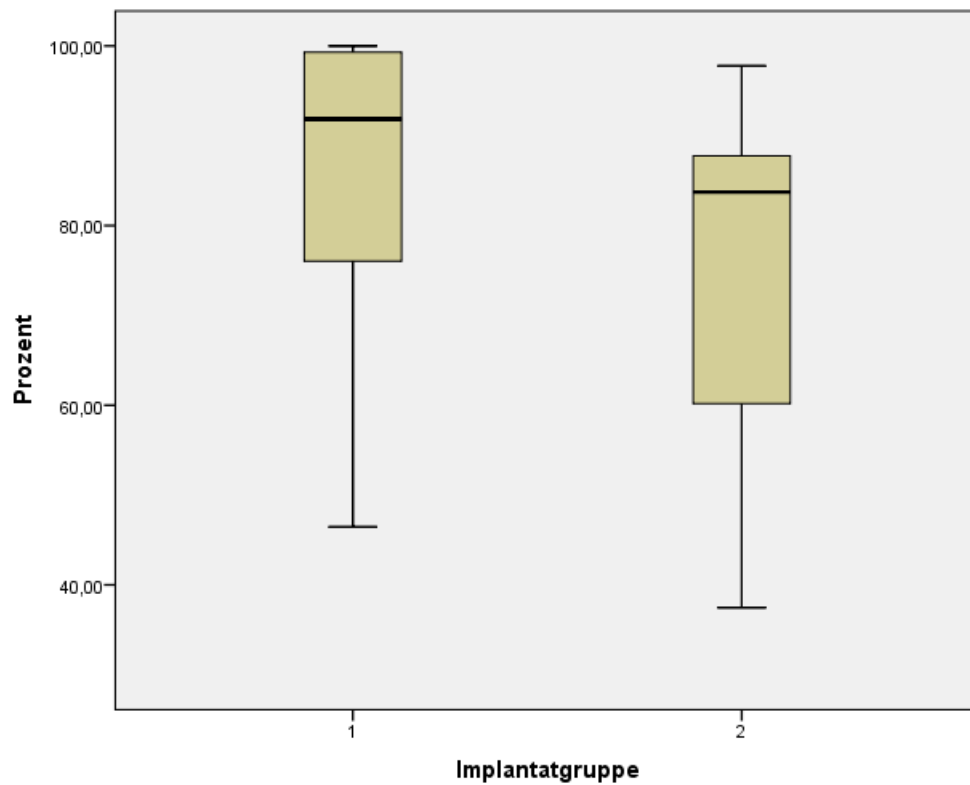


Abbildung 24: Relative Zementresorption von Implantatgruppe 1 und Implantatgruppe 2 ein Jahr post operationem

3.4 Statistische Auswertung entnommener Organproben

3.4.1 Eisenablagerungen in den Organen

Untersucht wurde folgender Zusammenhang:

Gibt es Unterschiede in den Eisenablagerungen der entnommenen Organe zwischen der Implantatgruppe 1, der Implantatgruppe 2 und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem?

Für die Eisenablagerungen in den einzelnen Organen (Abb. 25, Abb. 26 und Abb. 27) wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (Tab. 2). In keinem der untersuchten Fälle wurde ein p-Wert unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von 0,05 ermittelt. Es bestehen somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Eine weitere Testung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte daher ausbleiben.

	ln. popliteus sinister	ln. popliteus dexter	ln. iliofemor alis sinister	ln. iliofemor alis dexter	Gehirn	Lunge	Herz	Leber	Niere
Chi-Quadrat	1,863	1,451	1,837	0,804	0,000	0,245	2,111	3,216	0,206
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Asymptoti- sche Signifikanz	0,394	0,484	0,399	0,669	1,000	0,885	0,348	0,200	0,902

Tabelle 2: Statistik für Kruskal-Wallis-Test für die Eisenablagerungen in den entnommenen Organen, der Implantatgruppen 1 und 2 sowie der Kontrollgruppe

Es zeigten drei Tiere der Kontrollgruppe, fünf der Implantatgruppe 1 und sieben der Implantatgruppe 2 Eisenablagerungen in den lnn. iliofemorales dexter. Zu Eisenablagerungen in den lnn. poplitei dexter kam es bei zwei Tieren der Kontrollgruppe, drei der Implanatgruppe 1 und vier der Implantatgruppe 2.

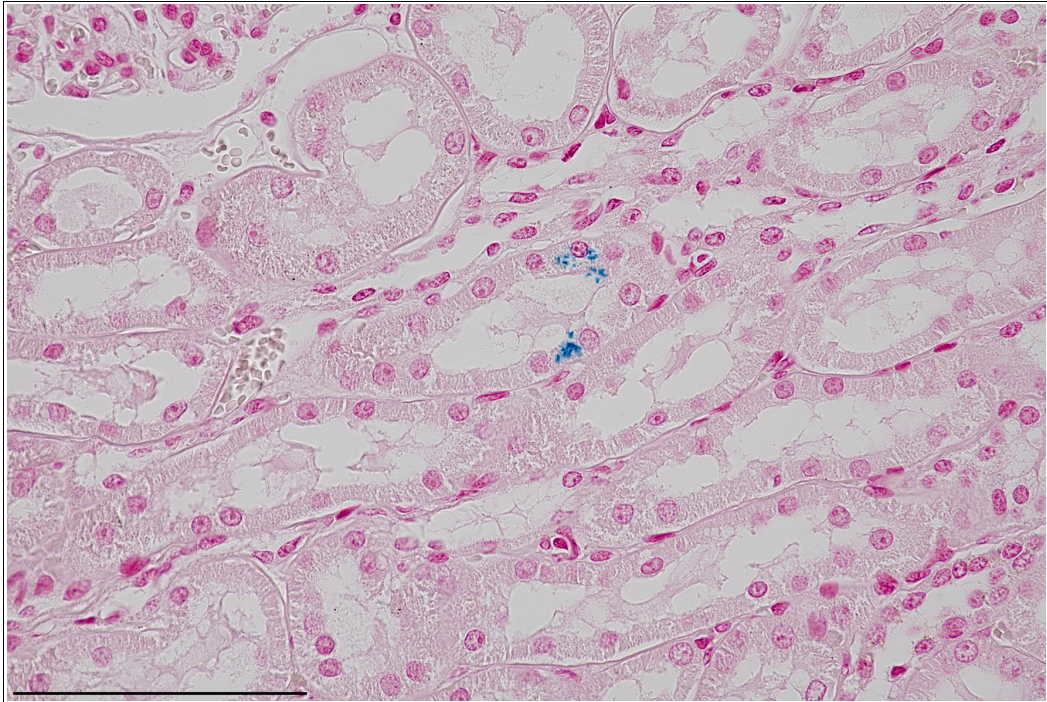


Abbildung 25: Schaf Implantatgruppe 2, Turnbullblau Reaktion, Niere: einzelne Epithelien mit granulärem zytoplasmatischen, eisenhaltigen Material, Maßstab: 100µm

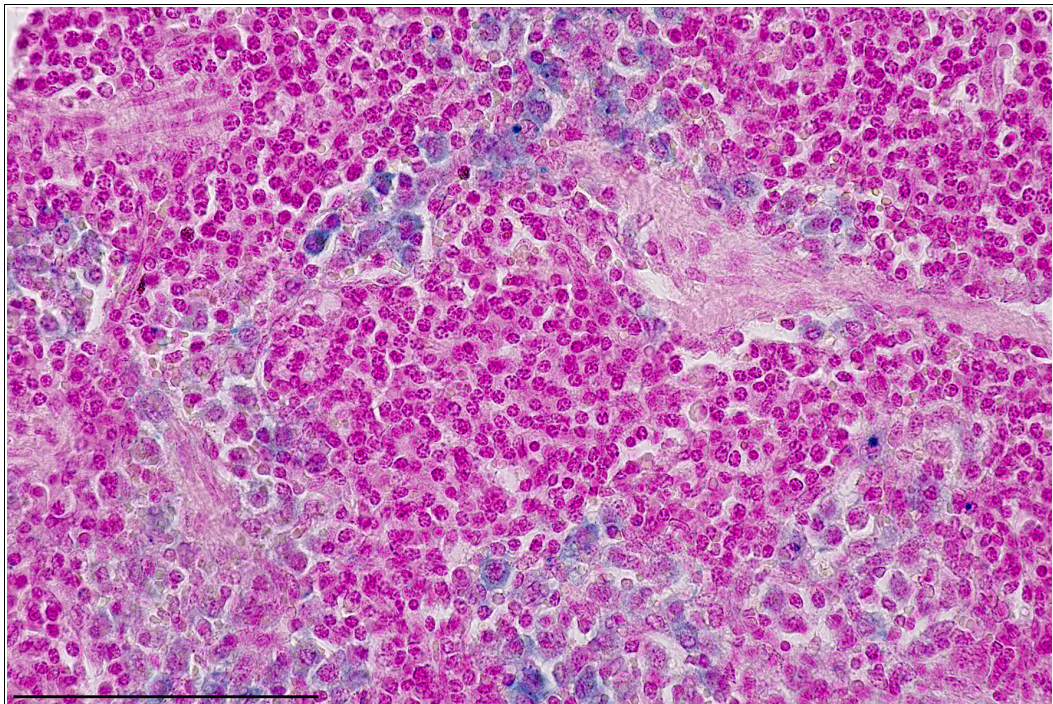


Abbildung 26: Schaf Implantatgruppe 2, Turnbullblau Reaktion, Ln. Iliofemoralis sinister: Bindegewebestrabekel assoziierte Makrophagen mit diffusem zytoplasmatischen, eisenhaltigen Material, Maßstab: 100µm

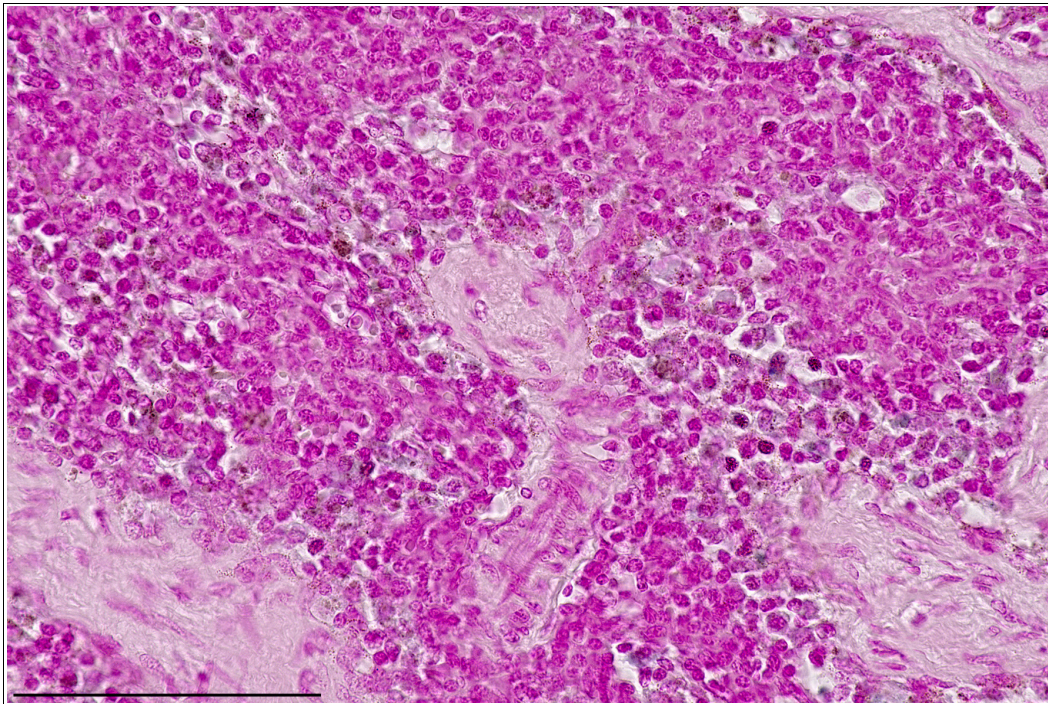


Abbildung 27: Schaf, Implantatgruppe 1, Turnbullblau Reaktion, Ln. popliteus dexter: Bindegewebestrabekel assoziierte Makrophagen mit granulärem zytoplasmatischen, eisenhaltigen Material, Maßstab: 100µm

3.4.2 Entzündliche Veränderungen in den Organen

Untersucht wurde folgender Zusammenhang:

Gibt es signifikante Unterschiede in den entzündlichen Veränderungen der entnommenen Organe zwischen der Implantatgruppe 1, der Implantatgruppe 2 und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem?

Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen p-Wert unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von 0,05. Somit gibt es signifikante Unterschiede zwischen mindestens zwei Gruppen (Tab. 3).

	Lunge	ln. popliteus sinister	ln. popliteus dexter	ln. iliofemo- ralis sinister	ln. iliofemo- ralis dexter	Gehirn	Herz	Leber	Niere	Milz
Chi-Quadrat	9,362	1,800	0,000	1,800	0,000	0,478	1,763	1,883	1,517	0,024
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Asymptoti- sche Signifikanz	0,009	0,407	1,000	0,407	1,000	0,787	0,414	0,390	0,468	0,988

Tabelle 3: Statistik für Kruskal-Wallis-Test für die entzündlichen Veränderungen in einzelnen Organen der Kontrollgruppe, der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2

Beim Vergleich von Implantatgruppe 1 und Implantatgruppe 2 ergab der Mann-Whitney-U-Test einen p-Wert unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von 0,05. Dies zeigt eine signifikante Erhöhung der entzündlichen Veränderungen der Lunge von Implantatgruppe 2 zu Implantatgruppe 1 (Tab. 4 und Tab. 5).

Die Histologie der aufgefundenen entzündlichen Veränderungen sind beispielhaft in den Abbildungen 29-31 aufgeführt.

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Lunge	Implantatgruppe 1	9	6,11	55,00
	Implantatgruppe 2	10	13,50	135,00
	Gesamt	19		

Tabelle 4: Statistik für Mann-Whitney-U-Test für die entzündlichen Veränderungen der Lunge der Implantatgruppen eins und zwei

	Lunge
Mann-Whitney-U	10,000
Wilcoxon-W	55,000
Z	-3,059
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,002
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,003 ^b

a. Gruppenvariable: Gruppe

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Tabelle 5: Statistik für Mann-Whitney-U-Test für die entzündlichen Veränderungen der Lunge der Implantatgruppen eins und zwei^a

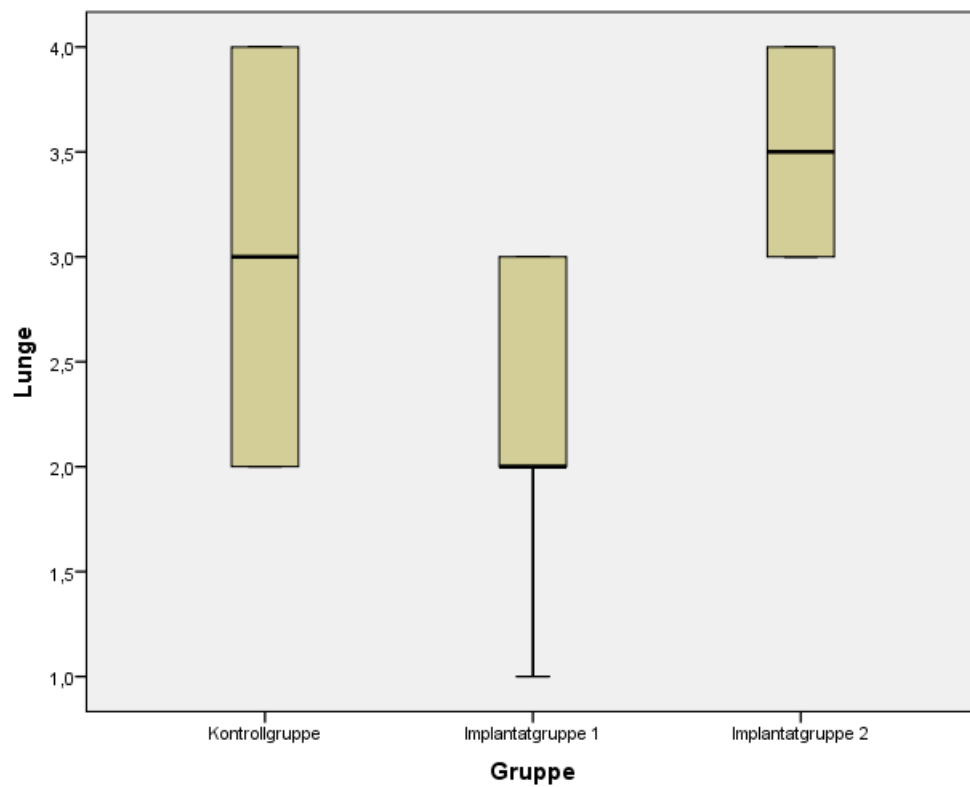


Abbildung 28: Signifikante Erhöhung der entzündlichen Veränderungen der Lunge von Implantatgruppe 2 im Vergleich zur Implantatgruppe 1, Ordinate zeigt die Gradation (1-4)

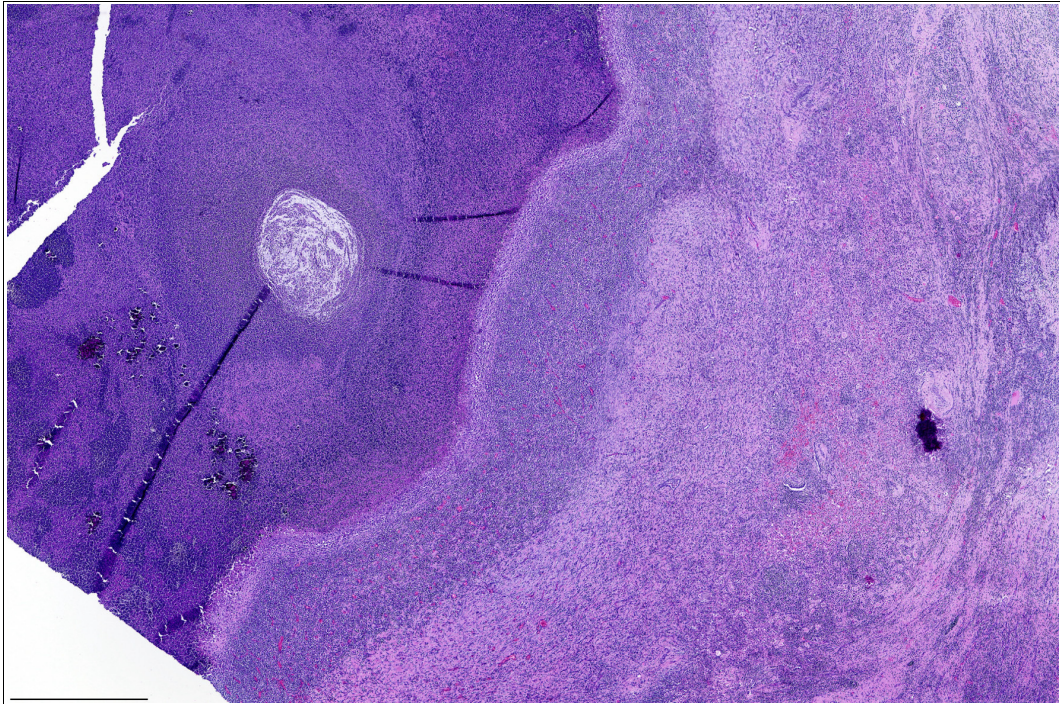


Abbildung 29: Schaf, Lunge, HE Färbung: chronischer Lungenabszess, Maßstab: 1mm

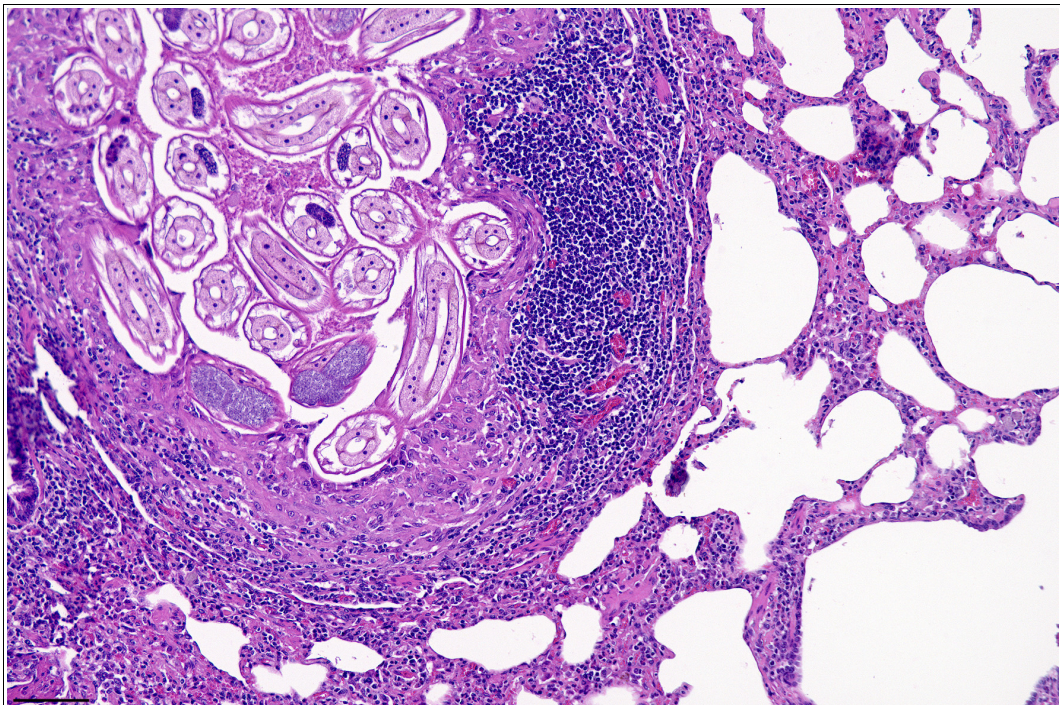


Abbildung 30: Schaf, Lunge, HE Färbung: chronische granulomatöse Pneumonie mit zahlreichen Parasitenanschnitten, Maßstab: 100µm

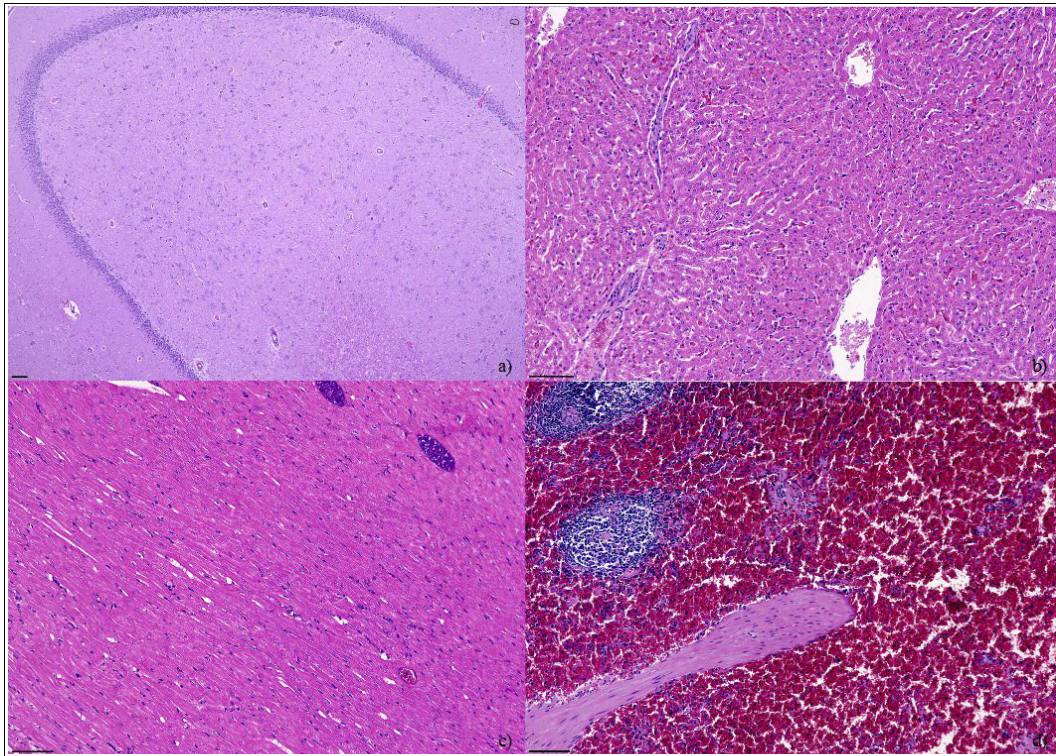


Abbildung 31: a) Schaf Hippocampus, HE-Färbung, o.b.B. b) Schaf Leber, HE-Färbung, o.b.B. c) Schaf Herz, HE-Färbung, einzelne Sarcocystis Zysten, sonst o.b.B. d) Schaf Milz, HE-Färbung, akute Stauung, vermutlich bedingt durch Euthanasie, Maßstab: 100µm

3.5 Beurteilung der Kontaktradiographie

Bei der Beurteilung der kontaktradiographischen Aufnahmen war es zunächst wichtig, die verschiedenen Strukturen mit unterschiedlicher Röntgendichte klar voneinander zu unterscheiden. Metall ist röntgendichter als Knochen und stellt sich somit in den Aufnahmen heller dar. Knochenzement weist je nach Zusammensetzung eine ähnliche Dichte wie physiologischer Knochen auf. Aufgrund von Abbauvorgängen zeigte sich der verbleibende Zement im Inneren des Implantates weniger dicht als der umliegende Knochen. Weichteildichte Strukturen stellen sich als leichte Verschattungen dar. Bei der Auswertung waren die Implantate als keilförmige, stark röntgendichte, spongiöse Struktur, mit einer weitaus weniger dichten, aber deutlich zu erkennenden Masse in ihrem Zentrum erkennbar. Die Metallschaumimplantate beider Gruppen waren von einem

Spaltraum, der sich als schmale Aufhellungszone darstellte, umgeben und erschienen frei schwebend, ohne Kontakt zum umgebenden Lagerknochen.

Nach digitaler Vergrößerung der Aufnahmen und zum Teil Veränderung der Wichtung zeigten sich die Implantate von einer Masse bindegewebiger Dichte umgeben, die aber nicht in allen Fällen den beschriebenen Spaltraum vollständig überbrückte (Abb. 32). Auch kontaktradiographisch ließen sich die Implantate in Zentralpartie, Übergangszone und Randpartie einteilen. Eine Knochenneu- oder Kallusbildung konnte lediglich in einem Fall beobachtet werden. Die eigentliche Diagnose einer Knochenneubildung erfolgte anhand des gefärbten Schnittes, jedoch finden sich auch in der Kontaktradiographie Zeichen für dieses Gewebe (Abb. 33). Deutlich zeigte sich, dass sämtliche Implantate nach lateral, also im Bereich der Spongiosa, von einer knöchernen Lamelle umgeben waren. Nach medial waren die Implantate nur bindegewebig bedeckt.

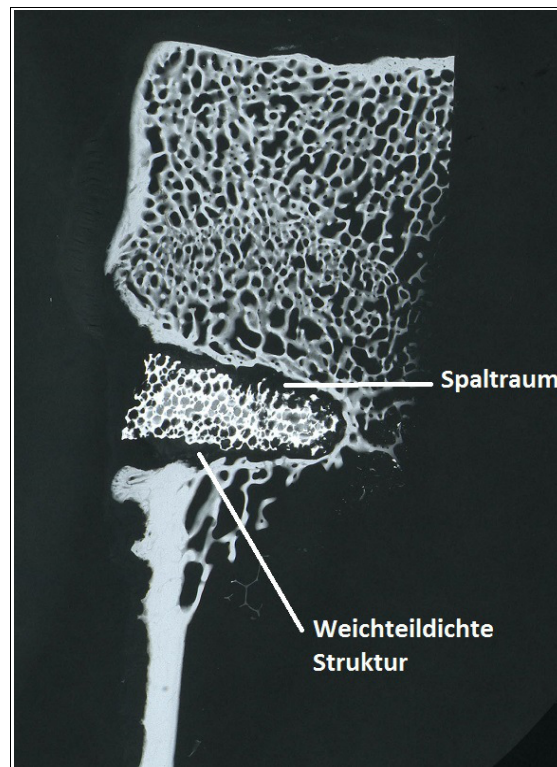


Abbildung 32: Schaf, Tibia Kontakt-radiographie, MMA Schliff Tier der Implantatgruppe 1 mit deutlicher Spalt-raumbildung

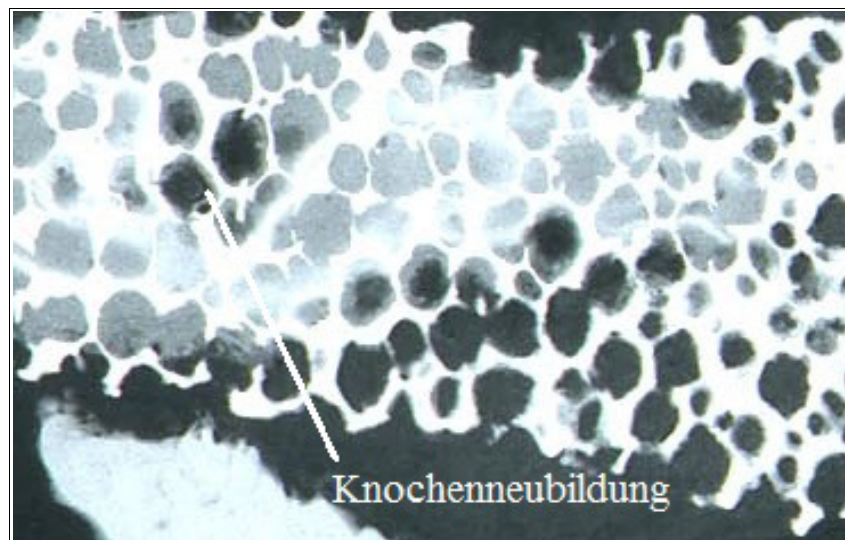


Abbildung 33: Schaf, Tibia, Kontaktradiographie, MMA Schliff Tier der Implantatgruppe 1, röntgendichte Struktur im Zentrum des Implantates, interpretiert als Knochenneubildung

3.6 Blutbild und Differenzialblutbild

Untersucht wurden folgende Zusammenhänge:

Gibt es signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2 im Blutbild und Differenzialblutbild zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate post operationem?

Es erfolgte eine Kruskal-Wallis-Testung, mit dem Ergebnis, dass in keinem Fall die Nullhypothese abgelehnt wurde. Somit gibt es keine signifikanten Unterschiede im Blutbild und Differenzialblutbild zwischen der Implantatgruppe 1, der Implantatgruppe 2 sowie der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate post operationem und eine weitere Testung mittels Mann-Whitney-U-Test konnte unterbleiben.

3.7 Serumwerte

3.7.1 Alkalische Phosphatase

Untersucht wurde folgender Zusammenhang (Tab. 6):

Gibt es einen signifikanten Unterschied im Serumspiegel der alkalischen Phosphatase 6 bzw. 12 Monate post operationem zwischen der Implantatgruppe 1, der Implantatgruppe 2 und der Kontrollgruppe?

	ALP U/L 6 Monate p.op.	ALP U/L 12 Monate p.op.
Chi-Quadrat	5,302	6,147
df	2	2
Asymptotische Signifikanz	0,071	0,046

b. Gruppenvariable: Gruppe

Tabelle 6: Statistik für Kruskal-Wallis-Test für den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase^b zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate post operationem.

Der Kruskal-Wallis-Test ergibt für die Verteilung der alkalischen Phosphatase zwischen der Implantatgruppe 1, der Implantatgruppe 2 und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem einen p-Wert von $p < 0,05$, sodass zwischen mindestens zwei Gruppen signifikante Unterschiede im Serumspiegel der alkalischen Phosphatase bestehen. Es folgte eine weitere Testung mittels Mann-Whitney-U-Test (Tab. 7 bis 10).

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ALP U/L 12 Monate p.op.	Kontrollgruppe	9	12,72	114,50
	Implantatgruppe 2	10	7,55	75,50
	Gesamt	19		

Tabelle 7: Statistik für Mann-Whitney-U-Test für den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase der Kontrollgruppe und der Implantatgruppe 1

	ALP U/L 12 Monate p.op.
Mann-Whitney-U	20,500
Wilcoxon-W	75,500
Z	-2,002
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,045
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,043 ^b

a. Gruppenvariable: Gruppe

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Tabelle 8: Statistik für Mann-Whitney-U-Test für den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase der Kontrollgruppe und der Implantatgruppe 1^a

Der Mann-Whitney-U-Test zeigt für den Vergleich von Kontroll- und Implantatgruppe 2 einen p-Wert unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von $p=0,05$. Damit zeigt sich eine signifikante Verringerung des Spiegels der alkalischen Phosphatase der Implantatgruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt zwölf Monate post operationem (Abb. 34).

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ALP U/L 12 Monate p.op.	Implantatgruppe 1	9	13,00	117,00
	Implantatgruppe 2	10	7,30	73,00
	Gesamt	19		

Tabelle 9: Statistik für Mann-Whitney-U-Test für den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2

	ALP U/L 12 Monate p.op.
Mann-Whitney-U	18,000
Wilcoxon-W	73,000
Z	-2,206
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,027
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,028 ^b

a. Gruppenvariable: Gruppe

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Tabelle 10: Statistik für Mann-Whitney-U-Test für den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2^a

Der Mann-Whitney-U-Test zeigt für den Vergleich von Implantatgruppe 1 und Implantatgruppe 2 einen p-Wert unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von $p=0,05$. Damit zeigt sich eine signifikante Verringerung des Spiegels der alkalischen Phosphatase der Implantatgruppe 2 im Vergleich zur Implantatgruppe 1 zum Zeitpunkt zwölf Monate post operationem (Abb. 34).

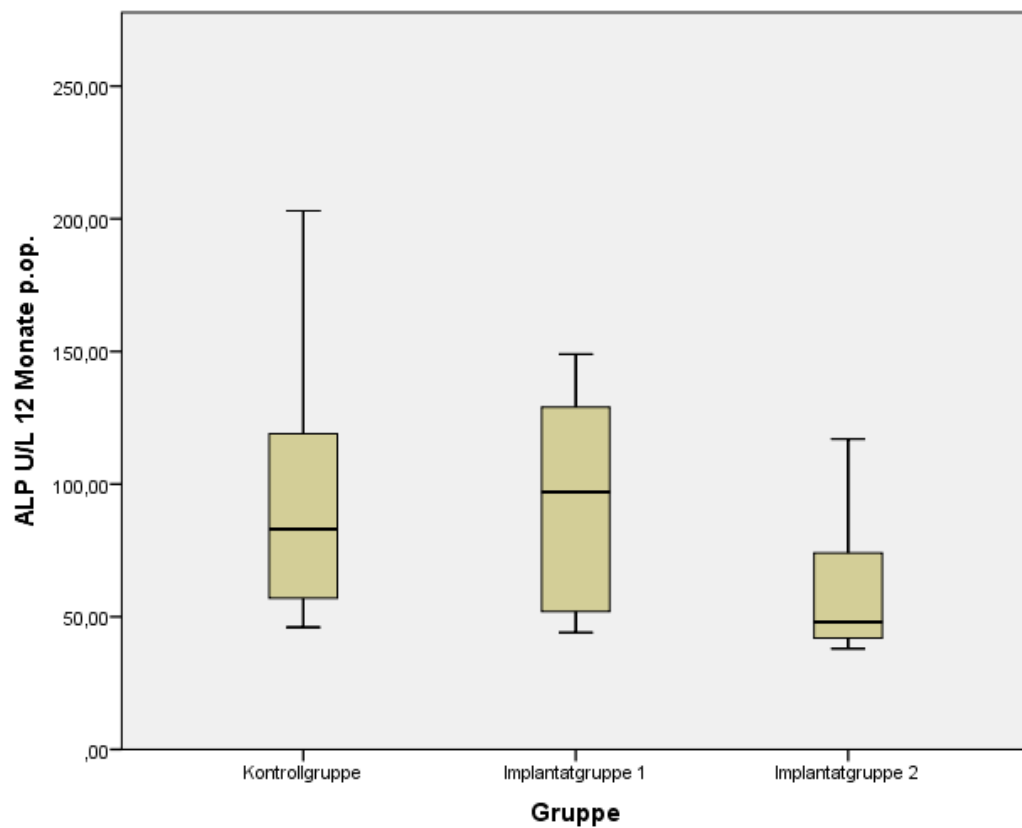


Abbildung 34: Signifikante Verringerung der alkalischen Phosphatase der Implantatgruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Implantatgruppe 1 zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem.

Für die Verteilung des Spiegels der alkalischen Phosphatase sechs Monate post operationem ergibt der Kruskal-Wallis-Test einen p-Wert von 0,71. Es besteht daher kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen (Tab. 11 und Abb. 35).

	ALP U/L 6 Monate p.op.
Chi-Quadrat	5,302
df	2
Asymptotische Signifikanz	0,071

Tabelle 11: Statistik für Kruskal-Wallis-Test für den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase der Implantatgruppe 1, der Implantatgruppe 2 und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt sechs Monate p.op.

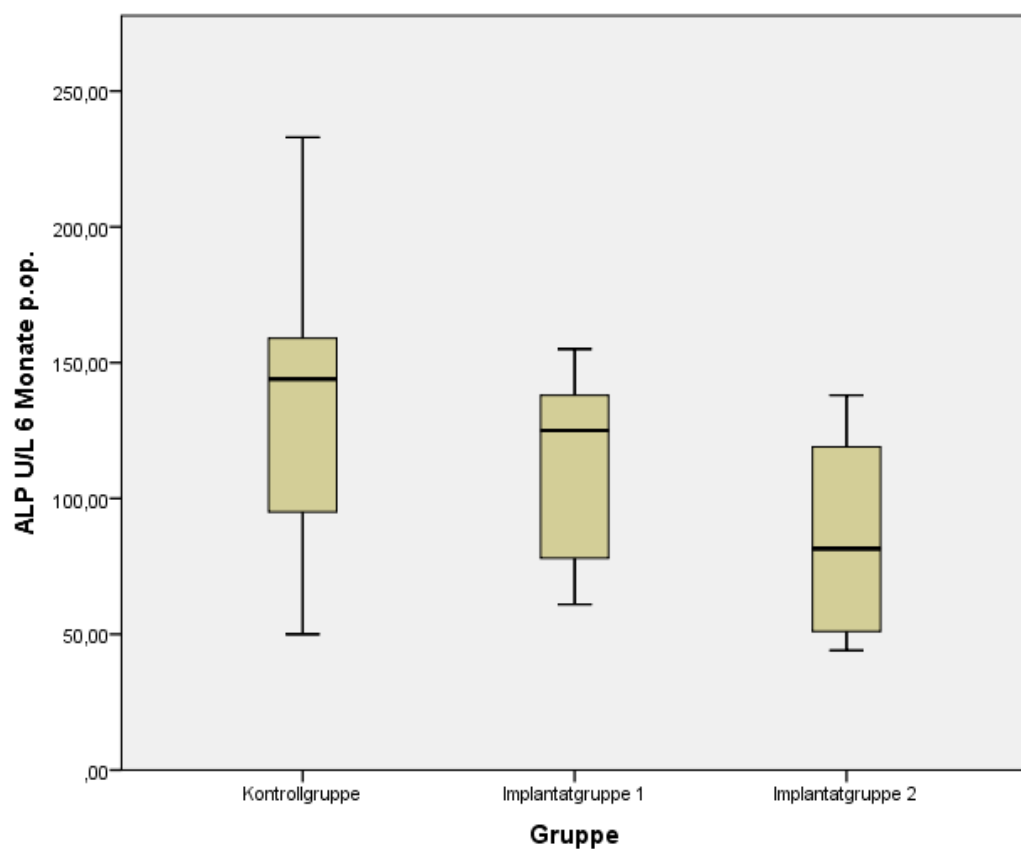


Abbildung 35: Keine signifikanten Unterschiede im Spiegel der alkalischen Phosphatase zum Zeitpunkt sechs Monate post operationem

3.7.2 Eisen, Phosphor, Ferritin

Für die Parameter Eisen, Phosphor und Ferritin wurde folgender Zusammenhang untersucht:

Gibt es signifikante Unterschiede in den Serumspiegeln oben genannter Parameter zwischen der Kontrollgruppe, der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2 zu den Zeitpunkten sechs bzw. zwölf Monate post operationem?

Die Testung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. In keinem der untersuchten Fälle lag die asymptotische Signifikanz unter dem festgelegten Niveau von $p=0,05$. Es bestehen somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den untersuchten Zeitpunkten und die Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests konnte unterbleiben.

Zur Veranschaulichung werden im Folgenden sämtliche Ergebnisse zusammengefasst (Tab. 12).

	Implantatgruppe 1	Implantatgruppe 2	Kontrollgruppe
Anzahl gesamt	n=9	n=10	n=9
Anzeichen von Degradation	n=9	n=10	n=0
Entzündliche Veränderung im Bereich des Implantatbettes	n=0	n=1	n=0
Knochenneubildung	n=1	n=0	n=0
Implantatresorption in %			
Eisenablagerungen in Organen			
Entzündliche Veränderungen in Organen		signifikante Erhöhung im Bereich der Lunge	
Spaltraumbildung zwischen Knochen und Implantat	n=9	n=10	n=0
Blut- und Differentialblutbild			
Alkalische Phosphatase 6 Mo p.op			
Alkalische Phosphatase 12 Mo p.op		signifikante Erniedrigung	
Eisen, Phosphor, Ferritin 6 Monate p.op			
Eisen, Phosphor, Ferritin 12 Monate p.op			

keine signifikante Veränderung
Tendenz zur Veränderung
signifikante Veränderung

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse

4 Diskussion

4.1 Tierversuch

Das Schaf stellt auf den Gebieten der orthopädisch unfallchirurgischen Forschung und der Knochenbruchheilung das Standardmodell für viele Versuche und Studien dar (SCHMIDT et al., 2006). Daneben werden im Bereich der Bioimplantologie auch Hunde, Ziegen, Schweine und Kaninchen verwendet. In seltenen Fällen werden sogar Pferde als Versuchstiere eingesetzt (PEARCE et al., 2007). Schafe hatten sich in Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe als gutmütige und widerstandsfähige Tiere erwiesen. Darüber hinaus sind sie kostengünstig zu beschaffen und in Haltung und Fütterung weitaus genügsamer als z.B. Hunde oder Pferde. Als Nutztiere sind sie in großen Zahlen verfügbar und als Lebensmittel liefernde Tiere weitaus weniger im Fokus von Tierversuchsgegnern als die klassischen Heim- bzw. Haustiere (NEWMAN et al., 1995). Durch ihre Größe und ihr Gewicht sind Schafe zudem in der Lage, die Belastung durch Implantationen, Blutentnahmen, etc. besser zu tolerieren als vergleichbare Versuchstiere (TURNER, 2002).

Ein weiterer Vorteil von Schafen ist die Ähnlichkeit in Größe und Gewicht zum Menschen und damit auch in der Belastung der Implantate (NUSS et al., 2006). Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass Schafe im Gegensatz zu z.B. Hunden in der Regel ihr Körpergewicht immer auf alle Gliedmaßen verteilen (NUNAMAKER, 1998). Der somit entstehende dauerhafte mechanische Reiz ist nach dem Wolff'schen Gesetz entscheidend für den Heilungsverlauf (RUFF et al., 2006). Auch die Knochenheilungsrate der Schafe ähnelt der des Menschen. Wenn auch bei Tieren im Allgemeinen von einer schnelleren Knochenheilung ausgegangen wird (MARTINI et al., 2001), stellt das Schaf im Rahmen dieser Studie das ideale Versuchstier dar.

4.2 Histopathologie

4.2.1 Organproben

Um entzündliche Veränderungen sowie Eisenablagerungen beurteilen zu können, wurden Proben der tributären Lymphknoten sowie von Lunge, Gehirn, Herz, Leber, Niere und Milz entnommen. Die histologische Beurteilung sämtlicher Organpräparate erfolgte ausschließlich durch einen Veterinärpathologen, um Abweichungen weitestgehend ausschließen zu können. Eine dadurch erzielte hohe Standardisierung war für die anschließende Erstellung eines Scores unerlässlich.

Die statistische Auswertung der entzündlichen Veränderungen zeigt eine signifikante Erhöhung von Entzündungsreaktionen der Lunge von Implantatgruppe 2 zu Implantatgruppe 1, jedoch nicht zur Kontrollgruppe. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass der signifikante Unterschied in der Legierung der Implantate liegt. So wurde für das Implantat der Implantatgruppe 2 0,5% Silizium verwendet. In der Literatur gilt vor allem Siliziumdioxid (SiO_2) als zytotoxisch und proinflammatorisch (PANAS et al., 2013). Zwar wurde in der genannten Studie die Wirkung von Metalloxid Nanopartikeln auf das Lungengewebe und Makrophagen *in vitro* untersucht, dennoch kann eine ähnliche Wirkung von oxidiertem Silizium *in vivo* nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Frage, ob bei der Degradation der Implantate auch SiO_2 freigesetzt wird, wurde in der eigenen Arbeit nicht untersucht.

In der Halbleitertechnologie wird eine Oxidschicht von Silizium in thermischen Verfahren, nämlich der trockenen und der nassen Oxidation erzeugt. Bei beiden Verfahren herrschen Temperaturen um 1000°C (HILLERINGMANN, 2014). Die Sintertemperaturen des in dieser Arbeit verwendeten Implantates erreichten ebenfalls mehr als 1000°C . Selbst bei Raumtemperatur, an der Luft oder unter Wasser kann Silizium eine natürliche Oxidschicht ausbilden (ALBERS, 2010). Da unter den genannten Bedingungen eine Oxidation von Si möglich ist, lässt sich zumindest nicht widerlegen, dass ein eventueller Zusammenhang zwischen den festgestellten, signifikant erhöhten entzündlichen Veränderungen der Lunge von

den Tieren der Implantatgruppe 2 und der Verwendung von Silizium besteht.

Eine weitere Möglichkeit für eine entzündliche Veränderung der Lunge stellt beim Schaf die verminöse Pneumonie dar. Ursachen hierfür sind in der Regel große (*Dictyocaulus sp.*) und kleine (*Protostrongylidae*) Lungenwürmer. Larven- bzw. Wurmanschnitte sind histologisch nicht immer darstellbar. Bei einem Befall zeigt sich in der Histologie meist eine massive Infiltration mit Leukozyten sowie eine Hypertrophie der glatten Muskulatur der Bronchioli (BAUMGÄRTNER, 2012). In vielen Fällen fungieren verminöse Pneumonien wegbereitend für weitere bakterielle Infektionen der Lunge (JENKINS et al., 2007). In der eigenen Arbeit ließen sich Parasiten der Lunge in sechs Fällen histologisch nachweisen. Ein Tier der Kontrollgruppe, zwei Tiere der Implantatgruppe 1 und drei Tiere der Implantatgruppe 2 zeigten Anschnitte von Lungenwürmern. Diese Tatsache allein genügt jedoch nicht als Beweis einer gänzlichen Abwesenheit von Parasiten bei den übrigen Tieren, die entzündliche Prozesse der Lunge zeigten. Aus diesem Grund muss die verminöse Pneumonie als mögliche Ursache für die entzündlichen Veränderungen der Lunge in Betracht gezogen werden.

Bei der Auswertung der Eisenablagerungen zeigten sich keine signifikanten Eisenmehrablagerungen im Vergleich von Implantatgruppe 1, Implantatgruppe 2 und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem. Auffällig hierbei war, dass sich auch in den Lymphknoten der nicht operierten, rechten Seite deutliche Eisenablagerungen zeigten. In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl bei der Entnahme als auch der späteren Bearbeitung nicht gänzlich auf die Verwendung metallischer Gegenstände verzichtet werden kann, muss unterstellt werden, dass es sich bei den vorliegenden Fällen um Artefakte oder um die Produkte einer Hämatomresorption handelt.

Histopathologisch wird eine übermäßige Eisenablagerung als Hämosiderose bezeichnet. In Kombination mit der daraus resultierenden Gewebsschädigung spricht man von einer Hämochromatose. Diese kann sowohl erblich als auch sekundär infolge einer erhöhten Eisenaufnahme auftreten (NIEDERAU, 2003;

SALLER et al., 2007). Betrachtet man diese Erkrankung, bei der übermäßig viel Eisen, bevorzugt in Organen wie Leber, Pankreas und Herz abgelagert bzw. gespeichert wird (HEENEY & ANDREWS, 2004; DUGGAN & DUGGAN, 2006), kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse insgesamt von einer geringen Belastung des Organismus durch den Degradationsprozess der Implantate ausgegangen werden.

Auch in Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte kein Zusammenhang zwischen dem Abbau eisenbasierter Implantate und signifikanten Eisenmehrablagerungen in parenchymatösen Organen festgestellt werden. In einer 2006 veröffentlichten Studie untersuchten PEUSTER und Mitarbeiter die Biokompatibilität von degradierbaren Eisenstents. Hierfür wurden Stents mit einem Durchmesser von 6-12 mm in die Aorta descendens von 29 Minipigs implantiert. Auch hier zeigten die histopathologischen Ergebnisse keine Eisenmehrablagerungen in Organen wie Leber, Herz, Niere, Lunge, Milz und Pankreas (PEUSTER et al., 2006). An dieser Stelle sei erwähnt, dass im Menschen und den meisten Säugetieren kein körpereigener Mechanismus zur aktiven Eisenausscheidung existiert. Zudem richtet sich die Resorption des enteral aufgenommenen Eisens nach dem aktuellen Bedarf. Die Ausscheidung erfolgt passiv über Stuhl bzw. Kot, Urin und Schweiß (SALLER et al., 2007; ZHAO & ENNS, 2012). Parenteral aufgenommenes Eisen kann von verschiedenen Zellen und Geweben aufgenommen werden, steht aber in seiner Gänze dem Organismus zur Verfügung, was dann zu einem Überangebot, der sog. Eisenüberladung führen kann. Hier akkumuliert das Eisen vor allem in Organen wie Herz, Leber und Milz (MUSUMECI et al., 2014). Dies bestätigt die Annahme der geringen Belastung des Organismus durch eisenbasierte Degradationsprodukte.

4.2.2 Tibiakopfpräparate

Bei der histologischen Auswertung der Tibiakopfpräparate wurden die Reaktion des um das Implantat liegenden Knochens, Bildung von Osteoid im Bereich des Implantates sowie Eisenablagerungen und histologisch nachweisbare entzündliche

Veränderungen in der direkten Umgebung untersucht. Zudem wurde die Degradation des eingebrachten Mg-CPC in relativen Zahlen bestimmt.

Es wurden Kontaktradiographien angefertigt, mit dem Ziel, das Einwachsen von Knochen sowie das Degradationsverhalten beurteilen zu können.

Die bei der makroskopischen Beurteilung auffälligen braunen, körnigen Strukturen, die sich auf der Schnittfläche der in aufsteigender Alkoholreihe entwässerten Präparate auch weiter außerhalb des Implantatbettes befanden, konnten in dieser Form histologisch nicht nachgewiesen werden. Somit bleibt der Ursprung der Strukturen weiterhin unklar. Als wahrscheinliche Ursache käme in Betracht, dass es sich bei den Strukturen um Produkte handelt, die beim Zurechtsägen der Implantate entstanden sind. Diese würden sich nur auf der äußeren Schnittfläche befinden und wären nach der Anfertigung der MMA Schriffe aus dem Zentrum des Implantates nicht mehr zu finden.

Histologisch zeigte sich im Implantatbett bei allen Tieren der Implantatgruppen eine braune Substanz, bei der es sich mit höchster Wahrscheinlichkeit um eine Ansammlung metallischer und nicht metallischer Degradationsprodukte handelt. Ein Gehalt an Fe^{3+} Ionen konnte im Rahmen der Nachweisgrenze histologisch ausgeschlossen werden. Das metallische Implantationsmaterial war bei allen Tieren zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem noch fast vollständig erhalten, was für einen langsamen Degradationsprozess spricht. Der Mittelwert für die Resorption des Knochenzements mit dem die Implantate befüllt waren, betrug zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem 80,4 %. Bei lediglich einem Präparat zeigte sich eine sowohl histologisch als auch röntgenologisch nachweisbare Knochenneubildung in der Übergangszone des Implantates. In Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte ein Einwachsen von Knochen in eisenbasierte Metallschaumbauteile ähnlicher Legierungen nachgewiesen werden. Verantwortlich für die geringe Knochenneubildung in der eigenen Arbeit könnten die im Vergleich zu Vorversuchen veränderte Porengröße des Metallschaumbauteils und die damit verbundene Metallreduktion sowie die

verwendete Mg-CP-Zementpaste und deren Abbauprodukte sein. In einer Studie aus 2015 untersuchten ZHANG und Mitarbeiter anhand von zylinderförmigen Implantaten den Effekt von Mg bei der Modifikation von Kalziumphosphatzementen auf die Adhäsion sowie die Differenzierung von Knochenmark-Stromazellen. Zum Einsatz kamen Implantate aus CPC sowie modifiziertem CPC mit einem Anteil von 5%, 10% und 20% MPC. Im Tierversuch wurden je zwei der porigen Bauteile in die Schädelkalotte von insgesamt 27 vier Monate alten, männlichen Ratten implantiert. Zu den Zeitpunkten zwei, vier und acht Wochen post operationem wurden die Tiere euthanasiert und nach Aufbereitung der ROI's histologisch sowie mikrocomputertomographisch untersucht. Nach vier Wochen zeigte sich ein deutliches Einwachsen von neuem Knochen über das gesamte Volumen des 5MCPC Implantates, ohne erkennbare Spaltbildung zum Lagerknochen. Wenn auch erheblich weniger, so fand sich bei den CPC- und 20MCPC-Bauteilen ebenfalls eine Neubildung von Knochen. Nach acht Wochen zeigten sich sowohl bei der 5MCPC- als auch bei der 20MCPC-Gruppe deutlich weniger Reste des eingebrachten Materials als bei der CPC-Gruppe. Dies spricht für eine schnellere Biodegradation des Mg-modifizierten CPCs (ZHANG et al., 2015). Die Ergebnisse zeigen einen positiven Effekt von Magnesium auf das Degradationsverhalten und die Osteoinduktivität des in der eigenen Arbeit verwendeten Knochenzementes. Hier muss unterstellt werden, dass die geringe Knochenneubildung in Zusammenhang mit der Struktur des Metallbauteils steht, oder durch die massenhafte Ansammlung von metallischen und nicht metallischen Degradationsprodukten verursacht wird.

In einer bereits unter 4.2.1 erwähnten Studie aus 2006 beschreiben PEUSTER und Mitarbeiter eine zeitabhängige Infiltration des an das Implantat angrenzenden Gewebes mit Immunzellen. Kurz nach der Implantation waren Granulozyten und Lymphozyten die vorherrschenden Zellen, welche im weiteren Verlauf von Makrophagen abgelöst wurden. Mehrkernige Riesenzellen fanden sich nur vereinzelt. Hochgradige Entzündungen oder toxische Effekte ließen sich nicht

nachweisen (PEUSTER et al., 2006). Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit. Entzündliche Veränderungen im Implantatbett und den umliegenden Bereichen ließen sich nur in einem Fall feststellen. Hier wurde sowohl in der Entzündungszone als auch außerhalb zellgebundenes Fremdmaterial nachgewiesen, welches nicht mit Sicherheit dem Implantat zugeordnet werden kann. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass es sich um Abbauprodukte aus dem entzündlich veränderten Bereich handelt.

Bei der histologisch nachweisbaren blauen schmalen Umrandung, von der das Implantatbett nach lateral umgeben war, handelt es sich um einen mit Fe^{3+} Ionen angereicherten Bereich. Dieser grenzt direkt an die knöchernen Strukturen des Implantatbettes an, weshalb vermutet werden kann, dass der Lagerknochen eine mechanische Barriere für Degradationsprodukte darstellt. Außerhalb dieses Bereiches, konnten keine wesentlichen Ablagerungen von dreiwertigem Eisen nachgewiesen werden. Dieses befand sich stark angereichert in der Zentralpartie des Implantates sowie in den davon abführenden tubulären Strukturen, welche in der Literatur bislang nicht beschrieben wurden. Hier kann nur diskutiert werden, ob diese Strukturen als Transportkanäle dienen, um z.B. Fe^{3+} -haltiges Material aus dem Implantatbett zu befördern. Es gilt jedoch zu beachten, dass dreiwertiges Eisen an Transferrin binden und so in den Zellstoffwechsel gelangen kann. So würde das Vorliegen von Fe^{3+} in diesem Fall dafürsprechen, dass Implantateisen abgebaut und im Wirtsorganismus weiter verarbeitet wird (YANG et al., 2012).

4.3 Kontaktradiographie

Um Knochenneubildung und die Degradation des Implantates beurteilen zu können, wurden Kontaktradiographien sämtlicher Präparate angefertigt.

Hier konnte der in der histologischen Auswertung beschriebene, fortgeschrittene Abbau des Knochenzementes bestätigt werden. Deutlich zeigte sich die zum Teil bindegewebig überbrückte Spaltraumbildung zwischen Implantat und einer neu gebildeten knöchernen Lamelle, von der die Implantate nach lateral umgeben waren. Auch die Kallusbildung konnte röntgenologisch nachgewiesen werden.

Dies spricht zum einen für einen Umbauprozess knöcherner Strukturen, zeigt aber deutlich ein Zurückweichen des Knochens im Implantatbett, was die Annahme, das Einwachsen von Knochen würde durch das Vorhandensein der Degradationsprodukte verhindert, unterstützt.

Da es im Verlauf des Tierversuches zu keiner Instabilität der Osteosynthesen gekommen ist und es röntgenologisch keinen Hinweis auf Frakturen gegeben hat, kann davon ausgegangen werden, dass trotz ausgebliebener knöcherner Durchbauung, der operierte Bereich zu jeder Zeit in der Lage war, die volle mechanische Belastung zu tragen.

4.4 Laborparameter

4.4.1 Referenzwerte

Referenzwerte für Laborparameter des Schafes sind in der Literatur in ausreichender Anzahl zu finden, weichen aber häufig voneinander ab. Als Orientierung wurden bei der Auswertung der Laboruntersuchung unter anderem die Referenzbereiche-Schaf der Klinik für innere Krankheiten der Pferde, Wiederkäuer und Schweine der Universität Leipzig, eine Studie von DIAS und Mitarbeiter (2008) sowie die von TSCHUOR und Mitarbeiter (2008) beschriebenen Referenzwerte zugrunde gelegt. Sofern sich die in dieser Arbeit ermittelten Werte im Referenzbereich befanden, wurde der Gruppenvergleich zur statistischen Beurteilung herangezogen.

4.4.2 Alkalische Phosphatase

Zur Gruppe der alkalischen Phosphatasen gehören verschiedene Isoenzyme. So existieren im menschlichen Körper die intestinale, keimzellspezifische, plazentaspezifische sowie die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase. Aus letzterer entstehen durch Glycosylierung weitere Isoenzyme, nämlich leberspezifische, knochenspezifische und nierenspezifische alkalische Phosphatase (MOSS, 1986; ALLEN, 2003).

Alkalische Phosphatasen sind, über eine glycosylphosphatidylinositol Verbindung, an die Zellmembran gebundene Proteine und werden von verschiedenen Zelltypen synthetisiert. In Blutserum bzw. -plasma kommen sie auch in gelöster Form vor (RAYMOND et al., 1991). Im Körper eines gesunden erwachsenen Menschen haben ca. 95% der ungebundenen alkalischen Phosphatasen ihren Ursprung in Leber oder Knochen und stellen somit einen verlässlichen Parameter für spezifische Krankheitsgeschehen oder physiologische Prozesse wie Knochenheilung dar (SHARP et al., 2007). Die bei erhöhter Osteoblastenaktivität freigesetzte knochenspezifische alkalische Phosphatase ist somit ein Indikator für vermehrt stattfindende Knochenumbauprozesse (ALLEN, 2003). Eine signifikante Erhöhung der alkalischen Phosphatase zu den Zeitpunkten 6 und 12 Monate post operationem konnte beim Vergleich der Gruppen im vorliegenden Versuch nicht festgestellt werden. In einer Studie aus 2005 untersuchten KOMMENOU und Mitarbeiter den Zusammenhang zwischen der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Knochenbruchheilung. Der Serumspiegel der alkalischen Phosphatase wurde an insgesamt 83 Hunden mit chirurgisch versorgten Frakturen der langen Knochen untersucht. Die Messungen wurden am Tag des Eingriffs, 10, 20 und 30 Tage post operationem sowie im Anschluss daran monatlich durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten ein Maximum der alkalischen Phosphatase 10 Tage post operationem. Zwei bis fünf Monate nach dem Eingriff lagen die Werte wieder im Referenzbereich (KOMMENOU et al., 2005). Eine weitere Studie beschreibt den Verlauf der alkalischen Phosphatase während der Knochenbruchheilung beim Menschen. Maximale Werte von bis zu 429 U/L werden nach 21 Tagen erreicht (MULJACIC et al., 2013). Es besteht somit die Möglichkeit, dass eine zu erwartende Erhöhung des Serumspiegels der alkalischen Phosphatase in den eigenen Untersuchungen nicht erfasst wurde. In der Literatur wird der Referenzbereich der alkalischen Phosphatase mit 15,0–331,0 U/L (DIAS et al., 2008) bzw. mit 60–300 U/L (KLINIK FÜR INNERE KRANKHEITEN DER PFERDE, 2016) angegeben. Sämtliche Werte der untersuchten Tiere lagen im Referenzbereich.

In der eigenen Arbeit zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der alkalischen Phosphatase zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem der Implantatgruppe 2 im Vergleich zur Implantatgruppe 1 und der Kontrollgruppe, die allerdings noch im Referenzbereich lag. In einer aktuellen Studie beschreiben ARUN und Mitarbeiter die Auswirkung verschiedener Schädel-Hirn-Traumata unter anderem auf den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase. Für diesen Versuch wurden Ratten durch unterschiedliche Methoden (Stoßwelle, stumpfer Schlag) Schädel-Hirn-Traumata zugefügt. Nach 6h bzw. 24h wurden die Tiere euthanasiert und im Anschluss Gehirn sowie Blutplasma entnommen. Der stumpfe Schlag bewirkte ein Absinken der alkalischen Phosphatase im Plasma um 32% und 37% zu den Zeitpunkten 6h und 24h nach Traumasetzung (ARUN et al., 2015).

Speziell bei der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase zeigt sich ein Absinken der Aktivität beim adulten Tier im Vergleich zum Jungtier. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass Knochenumbauprozesse sowie -neubildungen im erwachsenen Körper weitaus weniger stattfinden als beim heranwachsenden Tier (ARYA et al., 2015). In der eigenen Studie befanden sich alle verwendeten Schafe in etwa in demselben Alter. Daher kann ein Unterschied im Serumspiegel der alkalischen Phosphatase bedingt durch das Lebensalter der Tiere ausgeschlossen werden.

Als eine weitere Ursache für eine Erniedrigung der freien alkalischen Phosphatase kommt die Hypophosphatasie in Betracht. Hierbei handelt es sich um eine seltene Erkrankung, die mit einer Mutation des ALPL-Genes, welches die alkalischen Phosphatasen codiert, einhergeht. Dies resultiert in einer verminderten Aktivität vor allem von knochen-, leber- und nierenspezifischer alkalischer Phosphatase (LINGLART & BIOSSE-DUPLAN, 2016). Die Hypophosphatasie beim Tier ist in der Literatur nicht ausreichend beschrieben. Dennoch findet sie in einer Studie aus 2014 als mögliche Ursache für Zahn- und Gebissserkrankungen des Schafes Erwähnung (TATARA et al., 2014).

In der eigenen Studie gab es keine Anzeichen für genetische Vorerkrankungen

sowie Schädel-Hirn-Traumata. Zudem lagen alle Werte der alkalischen Phosphatase im Gesamtintervall der oben genannten Referenzwerte. Es ist somit davon auszugehen, dass der Eingriff keinen nennenswerten Einfluss auf den Serumspiegel der alkalischen Phosphatase hat. Dies konnte auch in Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden.

4.4.3 Serumeisen und Ferritin

Eisen stellt den Hauptbestandteil der verwendeten Implantate dar und wurde somit als Parameter für eine eventuelle Eisenbelastung des Organismus durch die Implantate herangezogen.

Eisen ist ein klassisches, essenzielles Spurenelement und wird überwiegend im Dünndarm, vor allem aber im Duodenum resorbiert. Die Ausscheidung von Eisen erfolgt überwiegend fäkal (VON ENGELHARDT & BREVES, 2005). Bei durchschnittlicher Ernährung nimmt ein Mensch ca. 20mg Eisen pro Tag auf. Die resorbierte Menge ist aber abhängig vom aktuellen Bedarf. So liegt bei weiblichen Individuen in der Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit oder während der Laktationsperiode, die Eisenaufnahme um ein Vielfaches höher (SALLER et al., 2007). Zudem richtet sich die Eisenresorption nach der Menge des aufgenommenen Eisens. Folgt auf eine Diät mit geringem Eisenanteil ein Wechsel zu einer eisenhaltigen Ernährung, sinkt die Resorption entsprechend. Dieses Phänomen findet auch in umgekehrter Form statt (BANNERMAN et al., 1962).

Rund 70% des Eisens im Körper eines Menschen findet sich gebunden im Hämoglobin. Dieses Enzym stellt mit Eisen als Zentralatom den Sauerstofftransport von der Lunge zu den übrigen Geweben sicher. Ferritin und Hämosiderin stellen die wichtigsten nicht Häm basierten Komponenten dar. Als Transportprotein ist Ferritin in der Lage bis zu 4500 Eisenionen (Fe^{3+}) in löslicher und nicht toxischer Form zu speichern (ROPELE & LANGKAMMER, 2016). Die Ferritinwerte korrelieren mit den Eisenreserven im Gewebe. So entspricht beispielsweise 1mg/l Ferritin 10mg Eisen im Gewebe (SALLER et al., 2007). Dieser Zusammenhang ist aber nicht immer verlässlich. So verstarben in den

letzten zwei bis drei Jahrzehnten an Thalassämie erkrankte Patienten an Herzversagen, aufgrund einer Eisenüberladung, trotz im Vorfeld festgestellter, im Referenzbereich gelegener Ferritinwerte (KOLNAGOU et al., 2006). Thalassämie ist eine chronische, erblich bedingte Erkrankung des Blutsystems, welche mit einer Reduktion der Hämoglobinsynthese einhergeht. Bei schweren Formen bedarf die aus der Erkrankung resultierende chronische hämolytische Anämie, einer Infusionstherapie mit roten Blutkörperchen. Dies führt häufig zu einer kumulativen Eisenüberladung (MARTIN & HAINES, 2016).

In der eigenen Arbeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2 im Serumeisenspiegel zu den Zeitpunkten 6 Monate und 12 Monate post operationem. Der in der Literatur angegebene obere Grenzwert von $34,3 \mu\text{mol/l}$ (TSCHUOR et al., 2008) wurde in drei Fällen zum Zeitpunkt sechs Monate post operationem überschritten. In zwei Fällen wurden die Tiere der Kontrollgruppe in einem Fall der Implantatgruppe 1 zugeordnet. Zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem wurde der Wert von $34,3 \mu\text{mol/l}$ in keinem Fall erreicht. Da der Höchstwert nur von einem Tier der Implantatgruppen um $2,6 \mu\text{mol/l}$ überschritten wurde, kann insgesamt von einer geringen Belastung des Organismus durch freies Eisen ausgegangen werden.

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich auch beim Vergleich der Ferritinwerte der drei Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten 6 Monate und 12 Monate post operationem. Referenzwerte für Ferritin beim kleinen Wiederkäuer konnten bei der Literaturrecherche nicht gefunden werden. Da nach SALLER und Mitarbeitern (2007) in der Regel eine Korrelation zwischen den Eisen- und Ferritinwerten besteht, ist davon auszugehen, dass Eisen ein bestimmendes Element für den Ferritinspiegel darstellt.

4.4.4 Phosphor

Mit 0,6 Legierungsprozent hat Phosphor, wie auch Silizium, einen vergleichsweise geringen Anteil an der metallischen Struktur des Implantates.

Allerdings kam es bei der Herstellung des Zementes zum Einsatz, mit dem die Metallschäume befüllt wurden. Eine genaue Untersuchung des Blutphosphorspiegels zu den Zeitpunkten 6 und 12 Monate post operationem war daher unerlässlich, um eine eventuelle Freisetzung von Phosphor erfassen zu können.

Phosphor gehört zu den Mineralstoffen und stellt zusammen mit Calcium den wesentlichen Bestandteil der mineralischen Knochensubstanz in Form von Hydroxylapatit dar. Im Körper eines Säugetieres liegt der Phosphorgehalt bei 4-7 g/kg, wobei hiervon ca. 80% auf das Skelett entfallen (VON ENGELHARDT & BREVES, 2005). Beim Menschen beträgt der Gesamtgehalt des im Körper gespeicherten Phosphors ca. 700g im Durchschnitt. Hiervon entfallen, ähnlich wie beim Säugetier, 85% auf das Skelett und 15% auf den Intrazellularraum. Lediglich 1% befindet sich in den extrazellulären Flüssigkeiten (HRUSKA et al., 2008). Die Phosphatkonzentration im Serum des Menschen beträgt ca. 0,8-1,4 mmol/l (NICOLL et al., 2015) und liegt damit niedriger als die in der Literatur angegebenen Referenzwerte für den kleinen Wiederkäuer. Diese betragen 1,2-2,3 mmol/l (TSCHUOR et al., 2008) bzw. 1,44-2,85 mmol/l (DIAS et al., 2008).

Die Phosphathomöostase wird hauptsächlich von drei Organen reguliert: Im Dünndarm findet die Phosphor- bzw. Phosphatresorption statt. Im Gegensatz dazu stellt die Niere das wichtigste Organ für die Phosphorexkretion dar. Der Knochen fungiert als Speicher (CHUN et al., 2016).

Die empfohlene Tagesdosis von Phosphor für einen erwachsenen Menschen liegt bei 700g/d (BERGMAN et al., 2009).

Schwankungen im Phosphorspiegel sind häufig abhängig von der Jahreszeit. Verantwortlich hierfür ist die unterschiedliche Verfügbarkeit von Futter- bzw. Nahrungsmitteln und deren divergierender Gehalt an Phosphor (PERNTHANER et al., 1993; BAUMGARTNER & PERNTHANER, 1994).

Ein zu erwartender Anstieg des Phosphorspiegels bis hin zu einer Hyperphosphatämie kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kommen eine

übermäßige Aufnahme sowie eine erhöhte Knochenresorption in Frage, zum anderen können eine mangelhafte renale Ausscheidung oder Medikamentengabe Ursache eines erhöhten Bluphosphorspiegels sein. Beim Menschen können selbst bei einer Arteriosklerose oder der koronaren Herzkrankheit erhöhte Werte auftreten (KAWAGISHI et al., 1995; BLOCK & PORT, 2000; GOODMAN et al., 2000; FOLEY et al., 2009).

Signifikante Unterschiede im Phosphorspiegel der Kontrollgruppe, der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2 zu den Zeitpunkten 6 bzw. 12 Monate post operationem konnten in der eigenen Arbeit nicht nachgewiesen werden. Zudem befanden sich alle Werte im Referenzbereich.

4.4.5 Blutbild und Differenzialblutbild

Um eventuelle entzündliche Prozesse auch hämatologisch nachweisen zu können, wurden Blut- sowie Differenzialblutbild untersucht und statistisch ausgewertet. In keiner der untersuchten Proben gab es signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2 zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate post operationem.

Differenzialblutbild:

Es wurde die Gesamtzahl der Leukozyten bestimmt und weiter nach neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, nach Lymphozyten sowie Monozyten differenziert. Die in der Literatur angegebenen Referenzwerte für Leukozyten weisen leichte Abweichungen auf: $4,0\text{--}12,0 \times 10^9/\text{L}$ (JACKSON & COCKROFT, 2007), $4,5\text{--}11,4 \times 10^9/\text{L}$ (TSCHUOR et al., 2008), bzw. $5,1\text{--}15,9 \times 10^9/\text{L}$ (LEPHERD et al., 2009). Eine wichtige Gruppe der Leukozyten stellen die Granulozyten dar. Diese färben sich histologisch in unterschiedlicher Weise an und werden daher in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt. Granulozyten erkennen Infektionserreger entweder indirekt nach Opsonisierung, oder indirekt mit Rezeptoren über sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (VON ENGELHARDT & BREVES, 2005). Sie

phagozytieren sämtliche Noxen wie Bakterien oder Fremdkörper (WEYRAUCH et al., 2009). Die in der Literatur angegebenen Referenzwerte für segmentkernige neutrophile Granulozyten liegen bei $0,7\text{--}6,0 \times 10^9/\text{L}$ (JACKSON & COCKROFT, 2007) und $1,07\text{--}6,74 \times 10^9/\text{L}$ (TSCHUOR et al., 2008). Keine in der eigenen Studie ermittelten Werte lagen außerhalb des Referenzbereiches. Zudem zeigten sich keine statistischen Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen.

Der Referenzbereich der eosinophilen Granulozyten von $0,04\text{--}1,04 \times 10^9/\text{L}$ (TSCHUOR et al., 2008) und $0,0\text{--}1,0 \times 10^9/\text{L}$ (JACKSON & COCKROFT, 2007) wurde in der vorliegenden Arbeit nur in einem Fall überschritten. Ein statistischer Zusammenhang mit den eingebrachten Implantaten besteht jedoch nicht.

Eine Eosinophilie weist auf eine eosinophile Entzündung, in der Regel ausgelöst durch eine Parasitose, hin. Unter Ausbildung einer digestiven Vakuole zwischen eosinophilen Granulozyten und Parasiten kommt es zur Degranulation. Hierbei wird die basische eosinophile Peroxidase freigesetzt, welche die Hülle von Parasiten und deren Eiern schädigt. Da die Halbwertszeit eosinophiler Granulozyten im Blut wesentlich kürzer ist als im Gewebe, kann eine eosinophile Entzündung auch ohne feststellbare Blut-Eosinophilie vorliegen (WILLARD & TVEDTEN, 2011).

Die Referenzwerte für basophile Granulozyten von $0,0\text{--}0,3 \times 10^9/\text{L}$ (KLINIK FÜR INNERE KRANKHEITEN DER PFERDE, 2016) und $0,0\text{--}1,5 \times 10^9/\text{L}$ (TSCHUOR et al., 2008) wurden in der eigenen Studie weder erreicht noch überschritten. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden nicht festgestellt.

Lymphozyten werden nach ihrem Ort der Ausdifferenzierung in B (Bone)- und T (Thymus)- Lymphozyten unterteilt. Die Aufgabe der B-Lymphozyten besteht hauptsächlich in der Produktion von Antikörpern im Rahmen einer Immunreaktion. T-Lymphozyten differenzieren sich in Helferzellen oder zytotoxische T-Zellen. Über das Blut wandern sie direkt zum Infektionsort (VON ENGELHARDT & BREVES, 2005). Im Vergleich zu den übrigen Wiederkäuern

sind die Lymphozyten der Schafe kleiner. Die in der Literatur angegebenen Referenzbereiche von $3,53 - 11,88 \times 10^9/L$, bzw. $2,0 - 9,0 \times 10^9/L$ wurden in keinem Fall überschritten (JACKSON & COCKROFT, 2007; TSCHUOR et al., 2008). Selbiges gilt auch für die Untersuchung der Anzahl von Monozyten. Zudem wurde kein signifikanter Anstieg der Monozyten, deren Hauptaufgabe es ist, Bakterien, Fremdkörper sowie nekrotisches Gewebe zu phagozytieren, im Blut nachgewiesen. Dies zeigt auch eine *in vitro* Studie von FESER und Mitarbeitern. Hier wurde der Einfluss von degradierbaren Magnesiumlegierungen auf die Funktion der dendritischen Zellen und Monozyten untersucht. Im Rahmen der Arbeit wurden keine Veränderungen an den Monozyten nachgewiesen (FESER et al., 2011). Auch PEUSTER und Mitarbeiter zeigten in einer Studie, in der degradierbare Eisenstents in die Aorta von Schweinen implantiert wurden, keine signifikante Veränderung der Leukozytenzahl (PEUSTER et al., 2006).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Implantate keine pathologischen, systemischen Immunreaktionen hervorrufen und somit als gut verträglich eingestuft werden können.

Hämoglobin und Erythrozyten:

Hämoglobin ist ein fast kugelförmiges Protein mit einem Durchmesser von ca. 5,5 nm. In erster Linie ist es für den Transport von Sauerstoff im Blut zuständig. Es befindet sich in hoher Konzentration im Cytosol von Erythrozyten, deren Hauptaufgabe wiederum darin besteht, den Transport von Hämoglobin und somit auch die Bindung und Freisetzung von Sauerstoff sicherzustellen (NELSON & COX, 2009). Die Erythrozyten von Schafen sind weitaus kleiner als die des Menschen, dafür aber in größerer Anzahl vorhanden (WELS, 1958). Dieser Größenunterschied erklärt auch die Abweichung im MCH (JONES & ALLISON, 2007). Die in der Literatur angegebenen Werte für das MCV liegen bei 27–34 fl (TSCHUOR et al., 2008), oder 28–40 fl (JONES & ALLISON, 2007).

Erythrozyten werden im Knochenmark gebildet. Die Erythropoese unterliegt dem Einfluss des in der Niere gebildeten Hormons Erythropoetin. Nach etwa 120

Tagen werden Erythrozyten, über das Monozyten-Makrophagen-System, in der Milz abgebaut. Erythropoetin ist ein potentes Glykoprotein und wird heutzutage zur Behandlung von Anämien unterschiedlichster Genese eingesetzt (DEBELJAK & SYTKOWSKI, 2012). Die in der Literatur angegebenen Referenzwerte für Erythrozyten von $8,7\text{--}12,9 \times 10^{12}/\text{l}$, bzw. $8,0\text{--}18 \times 10^{12}/\text{l}$ wurden in keinem Fall überschritten (JACKSON & COCKROFT, 2007; TSCHUOR et al., 2008). Zudem gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate post operationem. Auch PEUSTER und Mitarbeiter untersuchten in einer Studie an Schweinen mit degradierbaren Eisenstents Veränderungen von Erythrozyten und Hämoglobin. Auch hier konnten keine signifikanten Abweichungen bedingt durch die Implantation festgestellt werden (PEUSTER et al., 2006).

Thrombozytenzahl:

Thrombozyten haben ihren Ursprung im Knochenmark, wo sie zunächst als Megakaryozyten heranreifen. Die reifen Zellen verlassen das Knochenmark und zerfallen bei diesem Prozess in bis zu 1000 Thrombozyten. Kommt es dann zu einer Gefäßverletzung, lagern sich in kürzester Zeit Thrombozyten an die freigelegten Bindegewebsstrukturen (VON ENGELHARDT & BREVES, 2005). Wie Leukozyten so können auch Thrombozyten bei einer entzündliche Reaktion oder Stress erhöhte Werte aufweisen (JONES & ALLISON, 2007).

Die in der Literatur angegebenen Werte von $100\text{--}800 \times 10^3/\mu\text{l}$ bzw. $250\text{--}750 \times 10^3/\mu\text{l}$ wurden in keinem der untersuchten Fälle überschritten (SHERMAN & ROBINSON, 1983; JONES & ALLISON, 2007). Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe der Implantatgruppe 1 und der Implantatgruppe 2 zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate post operationem. Eine Thrombozytämie durch entzündliches Geschehen, Endotoxinfreisetzung oder ähnlichem hat zu keinem Zeitpunkt vorgelegen (IRMAK et al., 2006). Passend zu den eigenen Ergebnissen zeigten sich auch in einer Studie mit degradierbaren Eisenstents von PEUSTER und Mitarbeitern

keine signifikanten Veränderungen der Thrombozytenzahlen (PEUSTER et al., 2006).

Die Auswertung von Blut- und Differenzialblutbild zeigt keine größeren Abweichungen von den in der Literatur beschriebenen Referenzwerten. Auch bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Monate post operationem. Es gibt keine Anzeichen, dass durch das Implantat eine Immunreaktion in Form einer systemischen akuten oder chronischen Entzündung ausgelöst wurde. Insgesamt kann von einer geringen Belastung des Organismus durch die verwendeten Implantate ausgegangen werden.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch bei PEUSTER und Mitarbeitern. Keine Werte der untersuchten Parameter befanden sich außerhalb der Referenzbereiche (PEUSTER et al., 2006).

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung und Erprobung von abbaubaren Implantaten stellt ein wichtiges Gebiet der biomechanischen Forschung dar. So bietet die Verwendung von degradierbaren Knochenersatzwerkstoffen zur Überbrückung größerer Defekte viele Vorteile in den Bereichen der Orthopädie und Unfallchirurgie. Eingebrachte Implantate sind im Idealfall in der Lage die volle mechanische Belastung aufzunehmen, um diese dann im Laufe der Degradation an den einwachsenden Knochen zu übertragen. Als Leitgerüst wirken sie zudem osteokonduktiv und fördern so den Heilungsverlauf. Für den Patienten entfällt darüber hinaus eine weitere Operation zur Entfernung von nicht degradierbaren Implantaten.

Für die in der eigenen Arbeit verwendeten Implantate kamen FeP- und FePSi-Legierungen zum Einsatz. FeP-Legierungen hatten sich in Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe als geeignet erwiesen, um experimentell in Form von degradierbaren Implantaten eingesetzt zu werden. Die Dichte der im vorliegenden Projekt verwendeten Metallschaumbauteile betrug $0,4\text{--}0,6\text{ g/cm}^3$ mit einer Porosität von 70ppi. Die Poren wurden mit einer Mg-CPC Paste befüllt, um so das metallische Implantationsmaterial zu reduzieren ohne dabei die mechanischen Eigenschaften negativ zu beeinflussen. Mg-CPC wurden bereits in mehreren Studien als gut verträglich und osteoinduktiv getestet.

Die eingebrachten Implantate zeichneten sich durch eine gute mechanische Belastbarkeit aus. Trotz der geringen Knochenneubildung, welche sich nur in einem Fall nachweisen ließ, kam es im Verlauf des Tierversuches zu keiner Instabilität der Osteosynthesen.

Entzündliche Veränderungen in direkter Umgebung des Implantates konnten nur in einem Fall nachgewiesen werden. Entzündliche Veränderungen der entnommenen Organe wiesen nur im Fall der Lunge signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf, welche sich aber nicht mit Sicherheit auf das Implantat zurückführen lassen. Die histologisch nachweisbaren Eisenablagerungen der Organproben zeigten keine signifikanten Unterschiede

zwischen den Gruppen, weshalb sich ein Zusammenhang mit dem eingebrachten Material nicht bestätigen lässt.

In der Auswertung der Entzündungsparameter der entnommenen Blutproben zeigte sich kein Hinweis auf einen akuten oder chronischen entzündlichen Prozess, der durch das Implantat bedingt sein könnte.

Bei der Untersuchung der Serumparameter konnte eine signifikante Erniedrigung der alkalischen Phosphatasen, zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem, der Implantatgruppe 2 im Vergleich zur Implantatgruppe 1 und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Sämtliche Werte befanden sich im Referenzbereich. Bei den untersuchten Serumparametern Eisen, Phosphor und Ferritin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, können sowohl das FeP- als auch das FePSi-Implantat als gut verträglich eingestuft werden und erscheinen in Bezug auf Festigkeit und Biokompatibilität geeignet, als degradierbarer Knochenersatz verwendet zu werden. Verbesserungsbedarf besteht in der Degradationsrate und der Osteoinduktivität. Dies gilt es durch weitere Forschungsansätze zu optimieren, da sie gegenwärtig den Anforderungen an die Degradationskinetik noch nicht genügen.

6 Summary

Development and trial of metal based biodegradable implants are major topics in biomechanical research. The use of degradable bone implants for repairing large defects, offers a lot of advantages in orthopedic and trauma surgery. Metal based implants ideally can bear the full mechanical load and give it, during the process of degradation, to the ingrown bone. As a scaffold they act osteoconductive and promote healing. For the patient the use of a degradable implant means no further surgery for removing non degradable materials.

In the own study we used FeP- and FePSi-alloys, as they have shown to be suitable materials in earlier trials. We were using a metal foam with a density of 0,4-0,6 g/cm³ and a porosity of 70ppi. The porous structure was filled with Mg-CPC in order to reduce the metal, without influencing the mechanical properties. Mg-CPC was tested to be biocompatible as well as osteoinductive.

Although there was only a small formation of new bone, the implants showed a good strength. No instability of osteosynthesis has been observed during the animal testing.

Inflammation in the near surroundings of the implant was detected in one case only. Without a proven relation to the implant, a significant increase of inflammatory alteration of lung tissue was determined. Accumulation of iron has been seen in the histopathological evaluation of organs. However there was no statistical relation or relation to the placed material as well.

When analyzing blood samples we found no hint to acute or chronic inflammatory processes caused by the implant.

At the point of 12 month post operationem, a significant decrease of serum alkaline phosphatases was detected, regarding implant group 2 in relation to implant group 1 as well as to the control group. All the data were within the reference values. For iron, phosphor and ferritin no statistical differences could be found.

Due to the results FeP- and FePSi-implants can be considered to be biocompatible and stable. Therefore materials seem to be suitable for the use as degradable implants. However there is need to improve degradation rate and osteoinductivity in following experimental trails because implants used do not achieve requirements of degradation kinetics yet.

7 Literaturverzeichnis

- Agarwal S, Curtin J, Duffy B, Jaiswal S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 2016; 68: 948-63.
- Albers J. Grundlagen integrierter Schaltungen. In: Bauelemente und Mikrostrukturierung München: Carl Hanser Verlag 2010: 83-91.
- Allen MJ. Biochemical markers of bone metabolism in animals: Uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology* 2003; 32: 101-13.
- Arun P, Oguntayo S, Albert SV, Gist I, Wang Y, Nambiar MP, Long JB. Acute decrease in alkaline phosphatase after brain injury: A potential mechanism for tauopathy. *Neuroscience Letters* 2015; 609: 152-8.
- Arya N, Moonarmart W, Cheewamongkolnimit N, Keratikul N, Poon-iam S, Routh A, Bumpenpol P, Angkawanish T. Osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in asian elephants (*elephas maximus*) at different ages. *The Veterinary Journal* 2015; 206: 239-40.
- Bannermann RM, O'Brien JRP, Witts LJ. Studies in iron metabolism. IV. Iron absorption in experimental iron deficiency. *Blood* 1962; 20: 532-46.
- Baumgartner W, Pernthaner A. Influence of age, season, and pregnancy upon blood parameters in austrian karakul sheep. *Small Ruminant Research* 1994; 13: 147-51.
- Baumgärtner W (2012) *Pathohistologie für die Tiermedizin*. Enke Verlag, Stuttgart
- Bergman C, Gray-Scott D, Chen J-J, Meacham S. What is next for the dietary reference intakes for bone metabolism related nutrients beyond calcium: phosphorus, magnesium, vitamin d, and fluoride? *Critical Reviews in*

- Food Science and Nutrition 2009; 49: 136-44.
- Block GA, Port FK. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation* 2000; 35: 1226-37.
- Block JE, Poser J. Does xenogeneic demineralized bone matrix have clinical utility as a bone graft substitute? *Medical Hypotheses* 1995; 45: 27-32.
- Calori GM, Colombo M, Mazza EL, Mazzola S, Malagoli E, Mineo GV. Incidence of donor site morbidity following harvesting from iliac crest or rib graft. *Injury* 2014; 45 Suppl 6: S116-20.
- Chun S, Bamba T, Suyama T, Ishijima T, Fukusaki E, Abe K, Nakai Y. A high phosphorus diet affects lipid metabolism in rat liver: A dna microarray analysis. *PLoS ONE* 2016; 11: e0155386.
- Claes LE. Mechanical characterization of biodegradable implants. *Clinical Materials* 1992; 10: 41-6.
- Debeljak N, Sytkowski AJ. Erythropoietin and erythropoiesis stimulating agents. *Drug Testing and Analysis* 2012; 4: 805-12.
- Dias IR, Viegas CA, de Azevedo JT, Costa EM, Lourenço P, Rodrigues A, Cabrita AS. Assessment of markers of bone formation under controlled environmental factors and their correlation with serum minerals in adult sheep as a model for orthopaedic research. *Laboratory Animals* 2008; 42: 465-72.
- Duggan JM, Duggan A, E. Haemochromatosis. In: *The Epidemiology of Alimentary Diseases* Dordrecht: Springer Netherlands 2006: 199-202.
- Feser K, Kietzmann M, Baumer W, Krause C, Bach FW. Effects of degradable Mg-Ca alloys on dendritic cell function. *Journal of Biomaterials Applications* 2011; 25: 685-97.

- Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1983; 246-52.
- Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 2009; 20: 397-404.
- Fontecave M, Pierre JL. Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie* 1993; 75: 767-73.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury* 2005; 36: S20-S7.
- Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342: 1478-83.
- Guarnieri R, Belleggia F, Ippoliti S, DeVilliers P, Stefanelli LV, Di Carlo S, Pompa G. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of maxillary sinus lift procedure using a highly purified Xenogenic graft (Laddec((R))). *Journal of Oral & Maxillofacial Research* 2016; 7: e3.
- Heeney MM, Andrews NC. Iron homeostasis and inherited iron overload disorders: an overview. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2004; 18: 1379-403.
- Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T. Resorbierbare Knochenersatzmaterialien. *Der Orthopaede* 2011; 40: 761-73.
- Heublein B, Rohde R, Kaese V, Niemeyer M, Hartung W, Haverich A. Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? *Heart* 2003; 89: 651-6.
- Hilleringmann U. Oxidation des Siliziums. In: *Silizium-Halbleitertechnologie*:

- Grundlagen mikroelektronischer Integrationstechnik Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden 2014: 21-31.
- Hofmann GO, Claes LE. Biodegradable implants in orthopaedic surgery. *Clinical Materials* 1992; 10: 1.
- Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1986: 290-305.
- Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney International* 2008; 74: 148-57.
- Irmak K, Sen I, Col R, Birdane FM, Guzelbektes H, Civelek T, Yilmaz A, Turgut K. The evaluation of coagulation profiles in calves with suspected septic shock. *Veterinary Research Communications* 2006; 30: 497-503.
- Jackson PG, Cockroft P. Appendix 2: Laboratory reference values: Haematology. In: *Clinical Examination of Farm Animals*: Blackwell Science Ltd. 2007: 302-.
- Jansson V, Muller PE, Thal S, Arnholz C, Milz S, Koch KU, Refior HJ. [A new resorbable bone-cartilage replacement transplant. Results of an animal experiment study]. *Der Orthopaede* 2000; 29: 151-7.
- Jenkins EJ, Veitch AM, Kutz SJ, Bollinger TK, Chirino-Trejo JM, Elkin BT, West KH, Hoberg EP, Polley L. Protostrongylid parasites and pneumonia in captive and wild thinhorn sheep (*ovis dalli*). *Journal of Wildlife Diseases* 2007; 43: 189-205.
- Jones ML, Allison RW. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2007; 23: 377-402.
- Kawagishi T, Nishizawa Y, Konishi T, Kawasaki K, Emoto M, Shoji T, Tabata T, Inoue T, Morii H. High-resolution b-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney International* 1995; 48: 820-6.

- Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research* 1971; 5: 161-229.
- Klinik für innere Krankheiten der Pferde WuS. Referenzbereiche - Schaf. <http://www.vetmed.uni-leipzig.de/ik/wmedizin/labor/diagnostik/referenzwerte/schaf.htm>: 2016: 24.04.2016.
- Kobbe P, Tarkin IS, Frink M, Pape HC. Gewinnung großvolumiger Spongiosamengen zur autologen Knochentransplantation aus dem femoralen Markraum. *Der Unfallchirurg* 2008; 111: 469-72.
- Kolnagou A, Economides C, Eracleous E, Kontoghiorghes GJ. Low serum ferritin levels are misleading for detecting cardiac iron overload and increase the risk of cardiomyopathy in thalassemia patients. The importance of cardiac iron overload monitoring using magnetic resonance imaging T2 and T2*. *Hemoglobin* 2006; 30: 219-27.
- Kommenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 2005; 34: 35-8.
- Lepherd ML, Canfield PJ, Hunt GB, Bosward KL. Haematological, biochemical and selected acute phase protein reference intervals for weaned female merino lambs. *Australian Veterinary Journal* 2009; 87: 5-11.
- Linglart A, Biosse-Duplan M. Hypophosphatasia. *Current Osteoporosis Reports* 2016: 1-11.
- Liu RL, Hurley MF, Kvryan A, Williams G, Scully JR, Birbilis N. Controlling the corrosion and cathodic activation of magnesium via microalloying additions of Ge. *Scientific Reports* 2016; 6: 28747.
- Liu YJ, Yang ZY, Tan LL, Li H, Zhang YZ. An animal experimental study of

- porous magnesium scaffold degradation and osteogenesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2014; 47: 715-20.
- Martin M, Haines D. Clinical management of patients with thalassemia syndromes. *Clinical Journal of Oncology Nursing* 2016; 20: 310-7.
- Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: A literature review. *Comparative Medicine* 2001; 51: 292-9.
- Moss DW. Multiple forms of acid and alkaline phosphatases: Genetics, expression and tissue-specific modification. *Clinica Chimica Acta* 1986; 161: 123-35.
- Mueller PP, May T, Perz A, Hauser H, Peuster M. Control of smooth muscle cell proliferation by ferrous iron. *Biomaterials* 2006; 27: 2193-200.
- Mueller PP, Arnold S, Badar M, Bormann D, Bach FW, Drynda A, Meyer-Lindenberg A, Hauser H, Peuster M. Histological and molecular evaluation of iron as degradable medical implant material in a murine animal model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 2012; 100: 2881-9.
- Muljadic A, Poljak-Guberina R, Zivkovic O, Bilic V, Guberina M, Crvenkovic D. Course and rate of post-fracture bone healing in correlation with bone-specific alkaline phosphatase and bone callus formation. *Collegium Antropologicum* 2013; 37: 1275-83.
- Musumeci M, Maccari S, Massimi A, Stati T, Sestili P, Corritore E, Pastorelli A, Stacchini P, Marano G, Catalano L. Iron excretion in iron dextran-overloaded mice. *Blood Transfusion* 2014; 12: 485-90.
- Nelson D, Cox M (2009) *Lehninger Biochemie*. Springer Verlag, Berlin. 1668
- Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995; 16: S277-S84.
- Nicoll R, Howard JML, Henein MY. A review of the effect of diet on

- cardiovascular calcification. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16: 8861-83.
- Niederau C. Hereditäre Hämochromatose. *Der Internist* 2003; 44: 191-208.
- Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1998; 355: S56-S65.
- Nuss KMR, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2006; 7: 67-14.
- Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 144: 1-11.
- Panas A, Marquardt C, Nalcaci O, Bockhorn H, Baumann W, Paur HR, Mulhopt S, Diabaté S, Weiss C. Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology* 2013; 7: 259-73.
- Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells and Materials* 2007; 13: 1-10.
- Pernthaner A, Baumgartner W, Jahn J, Plautz W, Angel T. [The hematologic parameters, concentrations of minerals and metabolic products and activities of enzymes in sheep]. *Berliner und Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift* 1993; 106: 73-9.
- Peuster M, Wohlsein P, Brüggmann M, Ehlerding M, Seidler K, Fink C, Brauer H, Fischer A, Hausdorf G. A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal—results 6–18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* 2001; 86: 563-9.
- Peuster M, Hesse C, Schloo T, Fink C, Beerbaum P, von Schnakenburg C. Long-

- term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. *Biomaterials* 2006; 27: 4955-62.
- Pilliar RM. Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1983: 42-51.
- Räihä JE. Biodegradable implants as intramedullary nails. A survey of recent studies and an introduction to their use. *Clinical Materials* 1992; 10: 35-9.
- Raymond F, Datta H, Moss D. Alkaline phosphatase isoforms in bile and serum and their generation from cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1991; 1074: 217-22.
- Ropele S, Langkammer C. Iron quantification with susceptibility. NMR in Biomedicine 2016: n/a-n/a.
- Ruff C, Holt B, Trinkaus E. Who's afraid of the big bad Wolff?: "Wolff's law" and bone functional adaptation. *American Journal of Physical Anthropology* 2006; 129: 484-98.
- Saller R, Römer-Lüthi C, Brignoli R, Meier R. Eisen – ein zweischneidiges Schwert? Systematischer Review zur klinischen Bedeutung eines essenziellen Spurenelements. *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin / Swiss Journal of Integrative Medicine* 2007; 19: 96-103.
- Schmidt J, Grubert S, Günter M, Ekkernkamp A. Das Schaf als Versuchstier der Knochenbruchheilung – eine Normalwertanalyse. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 2006; 34: 27-34.
- Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ. Knochenersatzwerkstoffe. *Der Orthopaede* 2003; 32: 2-10.
- Sharif F, Ur Rehman I, Muhammad N, MacNeil S. Dental materials for cleft palate repair. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 2016; 61: 1018-28.

- Sharp CA, Linder C, Magnusson P. Analysis of human bone alkaline phosphatase isoforms: Comparison of isoelectric focusing and ion-exchange high-performance liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta* 2007; 379: 105-12.
- Sherman DM, Robinson RA. Clinical examination of sheep and goats. *The Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice* 1983; 5: 409-26.
- Song G. Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys. *Corrosion Science* 2007; 49: 1696-701.
- Takagi S, Chow LC. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 2001; 12: 135-9.
- Tatara MR, Szabelska A, Krupski W, Tymczyna B, Łuszczewska-Sierakowska I, Bieniaś J, Ostapiuk M. Morphometric, densitometric and mechanical properties of mandibular deciduous teeth in 5-month-old polish merino sheep. *BMC Veterinary Research* 2014; 10: 45-.
- Tschuor AC, Riond B, Braun U, Lutz H. Hämatologische und klinisch-chemische Referenzwerte für adulte Ziegen und Schafe. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2008; 150: 287-95.
- Turner AS. The sheep as a model for osteoporosis in humans. *The Veterinary Journal* 2002; 163: 232-9.
- Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 1997; 17: 232-41.
- von Engelhardt W, Breves G (2005) *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart. 682
- Wegener B, Schrimpf FM, Pietschmann MF, Milz S, Berger-Lohr M, Bergschmidt

- P, Jansson V, Muller PE. Matrix-guided cartilage regeneration in chondral defects. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2009; 53: 63-70.
- Wegener B, Schrimpf FM, Bergschmidt P, Pietschmann MF, Utzschneider S, Milz S, Jansson V, Muller PE. Cartilage regeneration by bone marrow cells-seeded scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 2010; 95: 735-40.
- Wegener B (2012) Zwischenbericht: Belastbare resorbierbare Implantate auf der Basis von zellularen Metallschäumen – DegraFer. Ed e.V. FGzFdAF
- Wels A. [Determination of the diameter of erythrocytes in the plasma and in smears from domestic animals]. *Blut* 1958; 4: 250-3.
- Weyrauch KD, Smollich A, Plendl J (2009) *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. Enke Verlag, Stuttgart
- Willard MD, Tvedten H (2011) *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis*. Urban & Fischer Verlag, München
- Winnacker K, Küchler L (1961) *Chemische Technologie*. Carl Hanser Verlag, München
- Wintermantel E, Ha S-W (2008) *Medizintechnik (Life Science Engineering)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* 2005; 26: 3557-63.
- Witte F, Ulrich H, Rudert M, Willbold E. Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 2007; 81: 748-56.
- Witte F, Calliess T, Windhagen H. Degradable synthetische Implantatmaterialien. *Der Orthopaede* 2008; 37: 125-30.
- Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta*

- Biomaterialia 2010; 6: 1680-92.
- Xu L, Pan F, Yu G, Yang L, Zhang E, Yang K. In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. Biomaterials 2009; 30: 1512-23.
- Yang N, Zhang H, Wang M, Hao Q, Sun H. Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the n-lobe. Scientific Reports 2012; 2: 999.
- Yusop AH, Bakir AA, Shaharom NA, Abdul Kadir MR, Hermawan H. Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review. International Journal of Biomaterials 2012; 2012: 641430.
- Zartner P, Cesnjevar R, Singer H, Weyand M. First successful implantation of a biodegradable metal stent into the left pulmonary artery of a preterm baby. Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions 2005; 66: 590-4.
- Zhang J, Ma X, Lin D, Shi H, Yuan Y, Tang W, Zhou H, Guo H, Qian J, Liu C. Magnesium modification of a calcium phosphate cement alters bone marrow stromal cell behavior via an integrin-mediated mechanism. Biomaterials 2015; 53: 251-64.
- Zhao N, Enns CA. Iron transport machinery of human cells: Players and their interactions. Current Topics in Membranes 2012; 69: 67-93.
- Zhu S, Huang N, Xu L, Zhang Y, Liu H, Sun H, Leng Y. Biocompatibility of pure iron: In vitro assessment of degradation kinetics and cytotoxicity on endothelial cells. Materials Science and Engineering: C 2009; 29: 1589-92.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metallographische Schliffe, Mikrostruktur einiger mittels Folien gießen hergestellter Proben mit den Legierungselementen Eisen, Silizium, Phosphor, Wolfram und Bor (Quelle: IFAM, Dr. Quadbeck).....	10
Abbildung 2: Implantationsfertiges gestrahltes Verbundbauteil aus Metallschaum und Mg-CPC (Quelle: IFAM Dr Quadbeck).....	13
Abbildung 3: Gruppeneinteilung zu Beginn des Tierversuches.....	15
Abbildung 4: TPLO Platte, Firma Synthes, Quelle: us.synthesvet.com.....	15
Abbildung 5: Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: intraoperativer Situs mit TPLO Platte, Tier der Kontrollgruppe.....	18
Abbildung 6: Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: intraoperativer Situs mit Implantat, Tier der Implantatgruppe 1.....	19
Abbildung : Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: p.op. Röntgenaufnahme , latero-lateraler Strahlengang, Tier der Kontrollgruppe mit TPLO Platte.....	21
Abbildung : Schaf, Kniegelenk, Erprobung eines eisenbasierten, degradierbaren Knochenersatzwerkstoffes: p.op. Röntgenaufnahme, latero-lateraler Strahlengang, Tier der Implantatgruppe 1.....	21
Abbildung : Schaf Tibiakopf, CT-Aufnahme 12 Monate p.op, Tier der Implantatgruppe 2, Longitudinalschnitt, Implantat als keilförmige Struktur zu erkennen. .	22
Abbildung : Schaf, Tibia, kontaktradiographische Aufnahme, MMA Schliff, Tier der Kontrollgruppe (links), Tier der Implantatgruppe 1 (rechts).....	23
Abbildung : finale Gruppeneinteilung.....	31
Abbildung : Schaf Tibia, Nativschnitt FePSi-Implantat, 12 Monate p.op (Erklärung siehe Text).....	32

Abbildung : Schaf Tibia, Nativschnitt FeP-Implantat 12 Monate p. op. (Erklärung siehe Text).....	33
Abbildung : Schaf, Tibia, MMA Schliff, Giemsa Eosin Färbung, metrische Einteilung der ROI's anhand der Zentralachse, Tier der Implantatgruppe 1.....	34
Abbildung : Schaf, Tibia, MMA Schliff, Giemsa Eosin Färbung, Implantat mit zweigeteilten ROI's, Tier der Implantatgruppe 2.....	35
Abbildung : Schaf, Tibia, MMA Schliff, Tier der Implantatgruppe 1, Giemsa Eosin Färbung, Knochenneubildung im Zentrum des Implantates.....	36
Abbildung : Schaf, Tibia, Nativschnitt, dunkelroter Randsaum zwischen Implantat und rotem Knochenmark spricht für ein entzündliches Geschehen, Tier der Implantatgruppe 2.....	37
Abbildung : Schaf Tibia, Paraffinschnitt, Implantatgruppe 2, HE Färbung. Zeichen von zellgebundenem Fremdmaterial in der Entzündungszone.....	38
Abbildung : MMA Schliff, Giemsa Eosin Färbung, Implantatgruppe 2, Hinweis auf entzündliche Reaktion im Implantat nahen Markraum.....	38
Abbildung : Schaf Tibia, Paraffinschnitt, Implantatgruppe 2, HE Färbung: Zellgebundenes Fremdmaterial im Fettmark, außerhalb der Entzündungszone....	39
Abbildung : Schaf Tibia, MMA Schliff. Berliner Blau Reaktion, Implantatgruppe 1 (Erklärung siehe Text).....	40
Abbildung : Schaf Tibia, MMA Schliff, Implantatgruppe 2, Berliner Blau Reaktion, Übergangszone und Randpartie mit Fe ³⁺ -haltigen tubulären Strukturen (1) und blaugefärbter knochenseitiger Umrandung (2).....	41
Abbildung : Schaf Tibia, MMA Schliff, Berliner Blau - Eosin Färbung, Tier der Kontrollgruppe, Spongiosa mit unverändertem Knochen, kein Eisen nachweisbar	42
Abbildung : Schaf Implantatgruppe 2, Turnbullblau Reaktion, Ln. Iliofemoralis sinister: Bindegewebsstrabekel assoziierte Makrophagen mit diffusem zytoplasmatischen, eisenhaltigen Material, Maßstab: 100µm.....	45
Abbildung : Schaf Implantatgruppe 2, Turnbullblau Reaktion, Niere: einzelne Epithelien mit granulärem zytoplasmatischen, eisenhaltigen Material, Maßstab:	

100µm.....	45
Abbildung : Schaf, Implantatgruppe 1, Turnbullblau Reaktion, Ln. popliteus dexter: Bindegewebestrabekel assoziierte Makrophagen mit granulärem zytoplasmatischen, eisenhaltigen Material, Maßstab: 100µm.....	46
Abbildung : Schaf, Lunge , HE Färbung: chronischer Lungenabszess, Maßstab: 1mm.....	50
Abbildung : Schaf, Lunge, HE Färbung: chronische granulomatöse Pneumonie mit zahlreichen Parasitenanschnitten, Maßstab: 100µm.....	50
Abbildung : a) Schaf Hippocampus, HE-Färbung, o.b.B. b) Schaf Leber, HE-Färbung, o.b.B. c) Schaf Herz, HE-Färbung, einzelne Sarcocystis Zysten, sonst o.b.B. d) Schaf Milz, HE-Färbung, akute Stauung, vermutlich bedingt durch Euthanasie, Maßstab: 100µm.....	51
Abbildung : Schaf, Tibia Kontaktradiographie, MMA Schliff Tier der Implantatgruppe 1 mit deutlicher Spaltraumbildung.....	53
Abbildung : Schaf, Tibia, Kontaktradiographie, MMA Schliff Tier der Implantatgruppe 1, röntgendichte Struktur im Zentrum des Implantates, interpretiert als Knochenneubildung.....	53
Abbildung 34: Signifikante Verringerung der alkalischen Phosphatase der Implantatgruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Implantatgruppe 1 zum Zeitpunkt 12 Monate post operationem.....	58

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. vet. W. Hermanns für die Überlassung des Themas, die Betreuung sowie die Anfertigung und Befundung der Organpräparate danken.

Besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer PD Dr. med. B. Wegener für die vielfältige Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit, die unzähligen Telefonate und motivierenden Worte sowie die Korrektur des Manuskriptes.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. med. S. Milz und Frau C. Harbauer für die freundliche und umfassende Unterstützung bei der Anfertigung und Beurteilung der Hartschnitt Präparate.

Frau Prof. Dr. med. vet. K. Hartmann und Frau PD Dr. med. vet. K. Weber danke ich für die Auswertung und Befundung der Blutproben.

Ich danke Herrn Dr. med. vet. K. Pieper für die Unterstützung während des Tierversuchs und den nachfolgenden Untersuchungen.

Des weiteren danke ich der Familie Hoyler für die Unterbringung und Versorgung der Schafe sowie die hervorragende Mittagsverpflegung, Herrn Dr. med. vet. M. Langenmayer für die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit und Frau A. Wiegand M.A. für das gewissenhafte Lektorat.

Besonders hervorheben möchte ich die liebevolle Unterstützung meiner Eltern, die mir das Studium der Tiermedizin ermöglicht, und immer an mich geglaubt haben.

Ganz besonders möchte ich schließlich meiner Frau Veronika für all die Unterstützung, Motivation und das Verständnis in den letzten Jahren danken sowie für die Betreuung unserer Söhne, die an so manchem Wochenende auf ihren Papa verzichten mussten.